

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
FISIOLOGIA**

**THÂMARAH DE ALBUQUERQUE LIMA**

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EM INTESTINO DE  
*Nasutitermes corniger*: DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
MODULAÇÃO POR LECTINAS TERMITICIDAS**

**RECIFE  
2012**

**THÂMARAH DE ALBUQUERQUE LIMA**

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EM INTESTINO DE  
*Nasutitermes corniger*: DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
MODULAÇÃO POR LECTINAS TERMITICIDAS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial  
das exigências para obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal  
de Pernambuco

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**RECIFE**

**2012**

Catálogo na Fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Lima, Thâmarah de Albuquerque**

**Atividades enzimáticas presentes em intestino de *Nasutitermes coniger*: detecção, caracterização e modulação por lectinas termiticidas/ Thâmarah de Albuquerque Lima– Recife: O Autor, 2012.**

**106 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2012.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Cupim 2. Enzimas 3. Lectinas I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora) II. Título**

**595.736**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2012- 232**



**THÂMARAH DE ALBUQUERQUE LIMA**

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EM INTESTINO DE  
*Nasutitermes corniger*: DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
MODULAÇÃO POR LECTINAS TERMITICIDAS**

Dissertação apresentada para o  
cumprimento parcial das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade  
Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica - UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO (Membro interno)  
Departamento de Bioquímica - UFPE

---

Prof. Dra. VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA (Membro interno)  
Departamento de Bioquímica – UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. MÁRCIA VANUSA DA SILVA (Membro externo)  
Departamento de Bioquímica – UFPE

Data: 16 / 04 / 2012

RECIFE  
2012

*Dedico às minhas queridas amigas*

*Ana Patrícia e Kézia Moura por  
tornar meus dias tão leves e  
sorridentes.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela graça da vida, pelas dádivas concedidas, por todos os momentos de alegria, tristeza e aprendizado e pela força nos momentos de fraqueza. Agradeço a Deus, pois Ele me dá coragem e determinação para enfrentar qualquer obstáculo com a certeza de que *“Eu tudo posso Naquele que me fortalece”* [Filipenses 4:13].

Agradeço aos responsáveis pelo o que hoje sou, minha família. Meus pais, Vânia e Cícero pela educação, pelo lar confortável, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Láisa e Lucas pelos momentos de descontração, amizade e amor. E, em especial, ao meu marido Márlon Hüther pelo amor e apoio.

Aos meus avós, tios e primos por fazer da minha vida mais aconchegante e agradável e por tornar os “momentos em família” sempre especiais. Em especial, agradeço à Tia Walmíria, Tia Vilma e Tio Valdésio pelo apoio em qualquer situação, pelo exemplo de perseverança, dedicação, comprometimento, Fé cristã e pelo amor demonstrado.

À minha orientadora Dra. Patrícia Paiva por acreditar na minha capacidade e confiar na minha competência. Pelo incentivo à pesquisa, pelos ensinamentos e conselhos, e pelo carinho demonstrado desde o primeiro dia que entrei para a o laboratório de glicoproteínas.

Ao meu braço direito e também amigo, Msc Thiago Henrique Napoleão, por sempre estar comigo em todas as etapas do processo de investigação e pesquisa: montagem de projetos, experimentos na bancada, análise estatística dos dados e interpretação e escrita do artigo.

Aos amigos Ana Patrícia de Oliveira, Kézia Santana de Moura, Emmanuel Pontual, Leonardo Prezzi, Afonso Agra, Igor Souza, Nataly Diniz, Lidiane Albuquerque, Cláudio Alves, Bernardo Belmonte, Poliana Karla, Pollyanna, Maiara Moura, Raiana Apolinário, Mychele Melo e demais integrantes do Laboratório de Glicoproteínas por fazerem do laboratório um ambiente familiar, descontraído e agradável de trabalho.

Aos funcionários do departamento de bioquímica, Djalma, Ademar, João, Maria, Miron, Dona Helena, Albérico, José Roberto e Jorge.

Ao CNPq, FACEPE, CAPES e UFPE pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito bela pra ser insignificante.*

**Charles Chaplin**



## RESUMO

*Nasutitermes corniger* é uma espécie de cupim-praga que causa danos em diversas construções. Enzimas digestivas possuem várias aplicações biotecnológicas e podem constituir alvos para o controle de insetos. O presente trabalho descreve a detecção das atividades de celulasas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase), hemicelulasas ( $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -xilanase),  $\alpha$ -amilase, e proteases (tripsina-símile, quimotripsina-símile, calicreína-símile e do tipo queratinase) em extratos de intestino de operários e soldados de *N. corniger*. As atividades enzimáticas foram avaliadas após incubação dos extratos de intestino em diferentes temperaturas e valores de pH e com lectinas termiticidas de *Myracrodruon urundeuva*. A adaptabilidade desta espécie de cupins para digerir materiais lignocelulósicos foi evidenciada pelos altos valores de atividade de endoglucanase e  $\beta$ -xilanase. Zimografia para proteases do extrato de operários revelou que polipeptídeos de 22, 30 e 43 kDa hidrolisaram caseína. Efeito de inibidores na atividade enzimática mostrou que serino proteases foram as principais proteases presentes no intestino de operários e soldados. As atividades tripsina-símile e calicreína-símile foram detectadas em maiores níveis. Os resultados dos ensaios de estabilidade frente ao aquecimento e pH revelam a presença de aparatos digestivos distintos entre operários e soldados. As lectinas de *M. urundeuva* afetaram diferentemente as atividades enzimáticas e sua atividade termiticida pode estar relacionada com a modulação de enzimas digestivas. O presente trabalho é uma etapa inicial no estudo do aparato digestivo de *N. corniger* e estimula a purificação e avaliação do potencial biotecnológico dessas enzimas.

**Palavras-chave:** *Nasutitermes corniger*; amilase; celulasas; hemicelulasas; serino proteases; *Myracrodruon urundeuva*; lectinas.

## ABSTRACT

*Nasutitermes corniger* is a termite pest that causes damage to several buildings. Digestive enzymes have several biotechnological applications and may consist in targets for insect control. This work reports the detection of the activities of cellulases (endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase), hemicellulases ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylanase),  $\alpha$ -amylase, and proteases (trypsin-like, chymotrypsin-like, kallikrein-like and keratinase-type) in gut extracts from *N. corniger* workers and soldiers. The enzyme activities were evaluated after incubation of gut extracts at different temperatures and pH values and with termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva*. The adaptability of this termite species to digest lignocellulosic materials was evidenced by the high values of endoglucanase and  $\beta$ -xylanase activities. Zymography for proteases of worker extract revealed that polypeptides of 22, 30 and 43 kDa hydrolyzed casein. Effect of protease inhibitors showed that serine proteases were the main proteases at worker and soldier gut. Trypsin-like and kallikrein-like activities were detected at highest levels. The results from heat and pH stability assays revealed the presence of distinct digestive apparatus between workers and soldiers. *M. urundeuva* lectins distinctly affected the enzyme activities and their termiticidal activity may be linked to modulation of digestive enzymes. This work is a first step on the study of *N. corniger* digestive apparatus and stimulates their purification and evaluation of biotechnological potential.

**Keywords:** *Nasutitermes corniger*; amylase; cellulase; hemicellulase; serine proteases; *Myracrodruon urundeuva*; lectins.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> (A) Aparelho mastigador e fontanela de cupim da espécie <i>Coptotermes formosanus</i> . (B) Principais partes do corpo de um soldado de <i>Nasutitermes</i> .	16
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida dos cupins e diferentes castas encontradas em um cupinzeiro.	18
<b>Figura 3.</b> (A) Protozoário flagelado e (B) espiroquetas simbiontes do intestino de cupins. (C) Operário de <i>Zootermes nevadensis</i> e trato digestivo dissecado de operário da mesma espécie.	21
<b>Figura 4.</b> <i>Nasutitermes corniger</i> . (A) Ninho. (B) Rainha. (C) Soldado (C1) e operário (C2). (D) Reprodutor alado.	23
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática dos pontos de clivagem por endoglucanases, exoglucanases e $\beta$ -glicosidases na estrutura da molécula de celulose	27
<b>Figura 6:</b> Arquitetura da parede celular vegetal.	29
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de ação enzimática de hemicelulases. (A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. (B) Hidrólise de xilo-oligosacarídeos pela $\beta$ -xilosidase. Ac: Grupo Acetil; $\alpha$ -Araf: $\alpha$ -arabinofuranose.	30

## ARTIGO

<b>Figure 1.</b> Effect of heating on endoglucanase (A and B), exoglucanase (C and D) and $\beta$ -glucosidase (E and F) activities from <i>N. corniger</i> worker (A, C and	81
--	----

E) and soldier (B, D and F) gut extracts.

**Figure 2.** Effect of heating on  $\beta$ -xylosidase (A and B),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (C and D) and  $\beta$ -D-xylanase (E and F) activities from *N. corniger* worker (A, C and E) and soldier (B, D and F) gut extracts. 84

**Figure 3.** Effect of heating on  $\alpha$ -amylase activity from *N. corniger* worker (A) and soldier (B) gut extracts. 86

**Figure 4.** Characterization of *N. corniger* gut extract in Tris buffer by electrophoresis in polyacrylamide gel. (A) SDS-PAGE of molecular mass markers (lane 1) as well as worker (lane 2) and soldier (lane 3) gut extracts. Zymography for proteases of worker (B) and soldier (C) gut extracts on SDS-PAGE containing casein. Arrows indicated polypeptide bands with proteolytic activity. 88

**Figure 5.** Effect of temperature on protease activities from *N. corniger* worker (A) and soldier (B) gut extracts. 89

**Figure 6.** Effect of temperature on trypsin-like (A and B) and kallikrein-like (C and D) activities from *N. corniger* worker (A and C) and soldier (B and D) gut extracts. 92

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

	Página
<b>Table 1.</b> Enzyme activities from gut extracts of <i>N. corniger</i> workers and soldiers.	80
<b>Table 2.</b> Effect of inhibitors on protease activity from worker and soldier gut extracts.	90

## SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. Cupins ou térmitas.....	16
2.1.1. Estratégias de alimentação dos cupins.....	19
2.1.2. <i>Nasutitermes corniger</i> .....	22
2.2. Enzimas digestivas em insetos .....	24
2.2.1. Celulases .....	24
2.2.1.1.Endoglucanases.....	26
2.2.1.2. Exoglucanases.....	27
2.2.1.3. $\beta$ -glicosidases.....	27
2.2.2. Hemicelulases .....	28
2.2.3. $\alpha$ -Amilases .....	30
2.2.4. Proteases .....	31
2.2.4.1. Serinoproteases.....	32
2.2.5. Aplicações biotecnológicas de enzimas digestivas .....	36
2.2.6. Enzimas digestivas como alvos para controle de insetos .....	38
2.3. Lectinas inseticidas .....	39
2.3.1. Lectinas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> .....	42
3. OBJETIVOS .....	44
3.1. Geral .....	44
3.2. Específicos .....	44
4. REFERÊNCIAS .....	46

5. ARTIGO .....	66
“Endoglucanase, $\alpha$ -amylase and protease activities from gut of <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera, Termitidae) workers and soldiers”	
6. CONCLUSÕES .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

Os cupins ou térmitas (Ordem Isoptera) são insetos que atuam como consumidores primários ou decompositores do ecossistema natural, tendo um papel ecológico primordial na reciclagem de nutrientes através da trituração, decomposição, humificação e mineralização dos recursos celulósicos e suas variantes (PRINS & KREULEN, 1991; TAYASU *et al.*, 1997; COSTA-LEONARDO, 2002). Porém, algumas espécies são nocivas causando danos em madeira comercial, estruturas em edificações, pinturas, livros antigos e monumentos de importância histórica (KORB, 2007). O cupim *Nasutitermes corniger* (Família Termitidae, Subfamília Nasutiterminae) é capaz de invadir o ambiente urbano, atacando madeira empregada em construções (PAES *et al.*, 2007).

Os cupins exploram alimentos com baixo valor nutricional, se comparados com os consumidores secundários e terciários. Com o intuito de extrair o máximo de nutrientes que são necessários a sua sobrevivência, esses insetos desenvolveram mecanismos digestivos apropriados (WALLER & LA FAGE, 1986). A alimentação com base em materiais lignocelulósicos é possível devido à presença no intestino dos cupins de celulasas com origem endógena, ou seja, codificadas pelo próprio genoma desses insetos (TOKUDA *et al.*, 2002), ou por dependência co-evolutiva de simbioses (bactérias e protozoários flagelados) presentes no trato digestivo (CLEVELAND *et al.*, 1934, BRESNAK & BRUNE, 1994). Enzimas proteolíticas permitem a digestão de componentes peptídicos da dieta e, assim, a obtenção dos aminoácidos essenciais.

O potencial biotecnológico de enzimas digestivas é bastante amplo. O aparato enzimático de insetos adaptados para a digestão de biomassa lignocelulósica têm atraído bastante interesse, devido às aplicações das enzimas envolvidas na bioconversão de materiais celulósicos em açúcares solúveis que podem ser utilizados para diferentes fins (MAMMA *et al.*, 2009), no amaciamento de jeans e no polimento de algodão e de outras fibras celulósicas



(MAGALHÃES, 2005), e diversas outras aplicações. Outras enzimas digestivas com aplicações biotecnológicas são as amilases, aplicadas na indústria alimentícia, têxtil e na indústria de papel (AEHLE & MISSET, 1999; GODFREY & WEST, 1996), e as proteases, utilizadas como constituintes de detergentes, no processamento de couro, na coagulação de leite e na maturação de carnes (CARVALHO, 2010). Com o avanço da biologia molecular e das técnicas de genômica e proteômica, essas enzimas podem ser clonadas e expressas em sistemas heterólogos, permitindo que as mesmas possam ser produzidas em larga escala para utilização na indústria.

Os processos digestivos de insetos também têm sido intensivamente estudados pelo fato das enzimas digestivas constituírem potenciais alvos em estratégias de controle de pragas. A adição de inibidores enzimáticos na dieta de insetos tem causado retardo no crescimento e diminuição na taxa de sobrevivência (MCMANUS & BURGEES, 1995, DE LEO *et al.*, 2001; ZAVALA *et al.*, 2004).

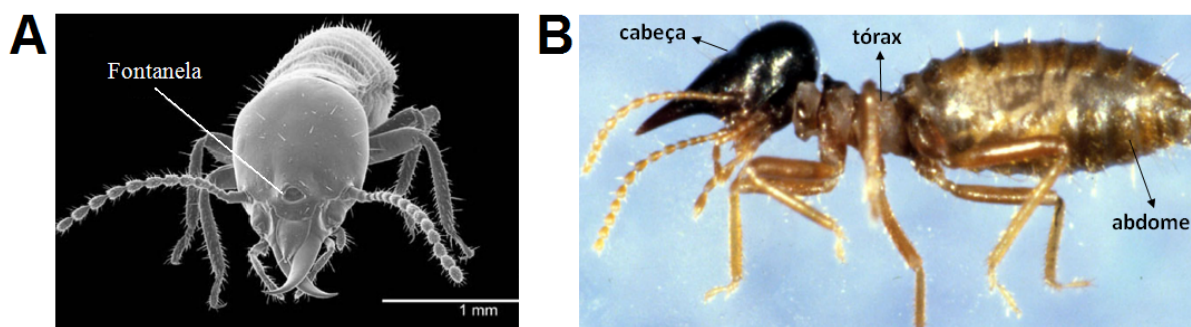
Lectinas (proteínas ou glicoproteínas que interagem específica e reversivelmente com monossacarídeos e glicoconjugados) têm apresentado atividade inseticida sobre insetos de diversas ordens, incluindo cupins (SÁ *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011b; SOUZA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012). Tem sido sugerido um dos mecanismos da ação inseticida de lectinas envolve a desestabilização do metabolismo do inseto devido à interferência nas funções enzimáticas (PAIVA *et al.*, 2012). As lectinas isoladas de entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folha (MuLL) de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) apresentaram atividade termiticida sobre *N. corniger* e foi sugerido que seus mecanismos de ação envolvem a propriedade ligadora de quitina, a resistência à digestão por proteases intestinais dos cupins e o efeito antibacteriano sobre simbiontes do trato digestivo desses insetos (NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

O presente trabalho aborda a detecção de atividades celulolítica, hemicelulolítica, amilolítica e proteolítica no intestino de operários e soldados de *N. corniger*, a caracterização parcial das enzimas envolvidas, e o efeito de lectinas termiticidas de *M. urundeuva* (MuBL, MuHL e MuLL) sobre as atividades enzimáticas detectadas. Dessa forma, o trabalho constitui um esforço para o conhecimento de enzimas que ocorrem no intestino de cupins dessa espécie, para a exploração do potencial biotecnológico inerente às enzimas digestivas detectadas, bem como para fornecer importante base para o estudo dos mecanismos de ação de lectinas com ação termiticida.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Cupins ou térmitas

O filo Insecta é o mais bem sucedido do Reino Animal, com mais de 1 milhão de espécies descritas, dentro de 30 ordens (GULLAN, 2007). Na Ordem Isoptera, encontram-se insetos conhecidos como cupins ou térmitas, que possuem um aparelho bucal bem desenvolvido do tipo mastigador (Figura 1A), cabeça livre com formas e tamanhos variáveis (Figura 1B) e olhos compostos, presentes nas formas aladas e nos cupins superiores. Na cabeça, há uma depressão chamada fontanela (Figura 1A), que possui um poro central no qual se abre uma glândula cefálica que secreta um líquido com função de defesa. O tórax (Figura 1B) é achatado, com o protórax destacado. O órgão auditivo está situado nas pernas, na tíbia anterior. O abdome é volumoso, sésil e apresenta 10 segmentos (Figura 1B). Os dois pares de asas são membranosos e o desenvolvimento é por paurometabolia (ovo→ninf→adulto) (GRASSÉ, 1949; GALLO *et al.*, 1988).



**Figura 1.** (A) Aparelho mastigador e fontanela de cupim da espécie *Coptotermes formosanus*.

(B) Principais partes do corpo de um soldado de *Nasutitermes*.

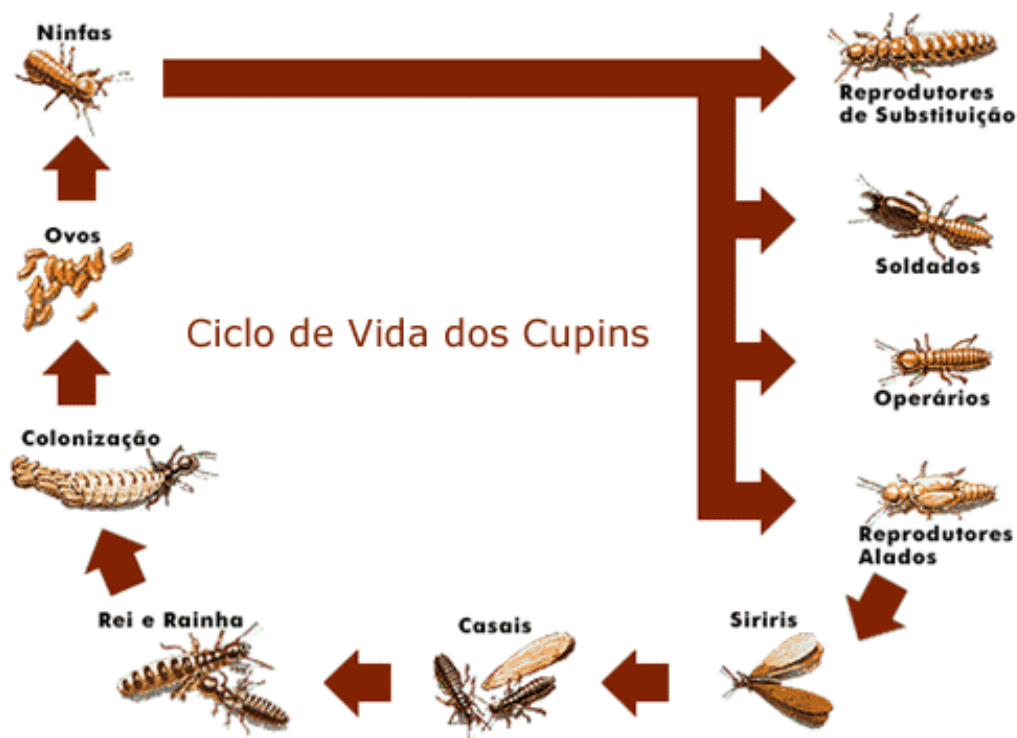
Fotos: (A) Scheffrahn & Su (2008). (B) United Nations Environment Program (Dr. Barbara L. Thorne).

A Ordem Isoptera compreende sete famílias: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae, que estão subdivididas em quatorze subfamílias (GRASSÉ, 1986; KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000). Os cupins das seis primeiras famílias são chamados “cupins inferiores”, enquanto que os cupins da família Termitidae são denominados “cupins superiores”. Essa designação refere-se à presença de protozoários flagelados e bactérias simbiontes que auxiliam na degradação da celulose no trato digestivo de térmitas inferiores, enquanto nos térmitas superiores, apenas bactérias simbiontes estão presentes (COSTA-LEONARDO, 2002).

Aproximadamente 2.858 espécies de cupins já foram descritas, das quais 537 são encontradas na região neotropical. No Brasil, ocorrem aproximadamente 300 espécies, que se distribuem entre as famílias Kalotermitidae (cupins primitivos que atacam madeira seca e não constroem ninhos; principais gêneros: *Cryptotermes* e *Neotermes*), Rhinotermitidae (constroem ninhos subterrâneos, atacando plantas vivas e madeira morta; principais gêneros: *Coptotermes* e *Heterotermes*), Serritermitidae (contendo apenas duas espécies, *Serritermes serrifer* e *Glossotermes oculatus*) e Termitidae (principal família dos cupins, constroem diferentes tipos de ninhos e têm hábito alimentar variado, como, por exemplo, folhas, madeira e húmus; principais gêneros: *Cornitermes*, *Nasutitermes*, *Syntermes* e *Anoplotermes*) (CONSTANTINO, 1999, PEDROSA-MACEDO *et al.*, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002; CONSTANTINO, 2007).

Os cupins são insetos eusociais que podem ser separados em castas morfisiologicamente distintas: reprodutores alados, operários, soldados e formas imaturas (Figura 2). As formas reprodutivas representam a casta fértil e são de dois tipos: os primários e complementares. Os reprodutores primários são o rei e a rainha; eles são pigmentados, apresentam asas bem desenvolvidas e possuem a função de produção de ovos e dispersão através de vôos colonizadores. Na maioria das colônias há apenas um par de reprodutores primários. Se os

reprodutores primários morrem, eles são substituídos pelos reprodutores complementares, que podem ter ou não asas e são mais pigmentados que os operários. As castas estéreis são representadas por operários e soldados, que não possuem asas e, geralmente, os olhos estão ausentes. Os operários são responsáveis pela busca de alimento para os jovens e os outros membros da colônia assim como para o consumo imediato; também têm a função de construir os túneis e galerias do ninho. Os soldados se diferem por possuírem a cabeça preta, alargada, com quase metade do comprimento do corpo e com o maxilar bem perceptível e são responsáveis pela guarda da colônia e seus ocupantes (KRISHNA & WEESNER, 1969; THOMPSON, 2000; PHILIP, 2004; MYLES, 2005).



**Figura 2.** Ciclo de vida dos cupins e diferentes castas encontradas em um cupinzeiro.

Fonte: AB Serviços Imunizadora

Os cupins atuam como consumidores primários ou decompositores (herbívoros e detritívoros). Sendo assim, têm um papel ecológico primordial na reciclagem de nutrientes através da trituração, decomposição, humificação e mineralização dos recursos celulósicos e

suas variantes. Cerca de 74 a 99% da celulose ingerida pelos cupins é hidrolisada (PRINS & KREULEN, 1991; TAYASU *et al.*, 1997; COSTA-LEONARDO, 2002). Porém, os cupins são mais conhecidos pelos danos e prejuízos que causam em plantações, edificações e construções que empreguem materiais de origem vegetal como matéria-prima. No entanto, as espécies consideradas como praga constituem a minoria, cerca de 10% (ZORZENON & POTENZA, 1998).

Os térmitas podem ser classificados conforme o tipo de ninho que constroem. Os ninhos inteiramente subterrâneos são construídos no solo. Os ninhos construídos em árvores, postes ou mourões estão ligados ao solo por túneis, visto que os térmitas utilizam material do solo para construir seus ninhos (BERTI FILHO, 1995). Os ninhos subterrâneos são os mais difíceis de controlar tanto por estarem escondidos no subsolo como pela sua rápida proliferação em ambientes urbanos (SANTINI, 1988).

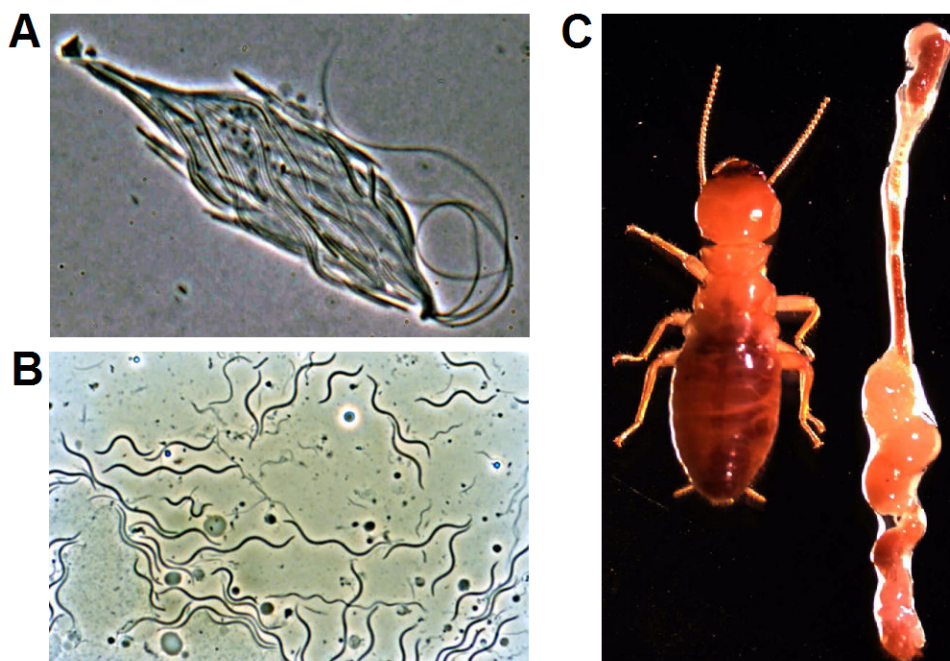
### **2.1.1 Estratégias de alimentação dos cupins**

Evidências obtidas a partir da análise de seqüências de DNA sugerem que os térmitas evoluíram a partir de baratas que se alimentavam de madeira, provavelmente durante o Período Jurássico (LO *et al.*, 2000; THORNE *et al.*, 2000; GRIMALDI & ENGEL, 2005; MEYER, 2005). Os cupins são chamados xilófagos porque, geralmente, assume-se que todos os cupins são consumidores de madeira, viva ou morta. Porém, uma grande diversidade de material orgânico, em vários estágios de decomposição, pode servir de alimento para esses insetos, incluindo gramíneas, plantas herbáceas, serrapilheira, fungos, ninhos construídos por outras espécies de cupins, excrementos e carcaças de animais, líquens e até mesmo material orgânico presente no solo (LIMA & COSTA-LEONARDO, 2007).

A chave evolutiva e os elementos ecológicos da biologia dos cupins, tais como o tamanho da colônia, a história de vida, o desenvolvimento de castas e os habitats (ninhos), estão associados à disponibilidade de recursos alimentares (ABE, 1987; LENZ, 1994). Se comparados com os consumidores secundários e terciários, os térmitas exploram alimentos com baixo valor nutricional, tendo desenvolvido mecanismos digestivos apropriados para extrair o máximo de nutrientes que são necessários a sua sobrevivência (WALLER & LA FAGE, 1986). Os cupins trituram os materiais celulósicos ou lignocelulósicos, mas a maior parte da digestão da celulose ocorre pela ação de enzimas produzidas por microrganismos simbioses presentes no intestino posterior (WALLER & LA FAGE, 1986). Segundo Oliveira *et al.* (1986), os térmitas que se alimentam de madeira utilizam os polímeros naturais da parede celular como fonte de alimento e, para isso, possuem sistemas enzimáticos específicos capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis. Os protozoários flagelados (Figura 3A) e as bactérias simbioses presentes no trato digestivo colaboram na digestão da celulose através de três tipos de enzimas denominadas endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (BRESNAK & BRUNE, 1994).

Mesmo apresentando desvantagens tais como baixo conteúdo de nitrogênio, dureza da madeira e potencial tóxico elevado, a dieta xilófaga é mantida pela maioria dos cupins, com destaque para a família Termitidae. Essa é a maior família de térmitas, sendo a subfamília Nasutitermitinae a mais diversificada do grupo Isoptera (HIGHLEY & KIRK, 1979; BIGNELL & EGGLETON, 2000; KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000). Estudos recentes de Warnecke *et al.* (2007), envolvendo análise metagenômica e funcional da microbiota associada a um cupim da família Termitidae, mostraram que há um conjunto muito diversificado de bactérias, tais como espiroquetas (Figura 3B) e fibrobactérias, que possuem genes relacionados com a degradação da lignocelulose e envolvidos na hidrólise de xilana e celulose. Dentre os cupins pertencentes à família Termitidae, muitas espécies das

sub-famílias Macrotermitinae e Nasutitermitinae se alimentam de madeira recém-abatida (LIMA & COSTA-LEONARDO, 2007).



**Figura 3.** (A) Protozoário flagelado e (B) espiroquetas simbiotes do intestino de cupins. (C) Operário de *Zootermes nevadensis* e trato digestivo dissecado de operário da mesma espécie.

Fotos: <http://www.laweekly.com/2006-04-13/columns/gut-reactions>. Jared Leadbetter/Caltech.

Alguns Nasutitermitinae têm se especializado no consumo de húmus, que consiste de minerais orgânicos, carboidratos, micróbios do solo, peptídeos hidrolisáveis, compostos polifenólicos e hexosaminas derivadas de restos de artrópodes e fungos (COLLINS, 1983; ANDERSON & WOOD, 1984; BIGNELL & EGGLETON, 2000; JI & BRUNE, 2005). Em cupins, enzimas proteolíticas têm grande importância na digestão de proteínas e componentes peptídicos presentes em substâncias húmicas do solo (JI & BRUNE, 2005). Dessa forma, os cupins obtêm muitos dos aminoácidos essenciais utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmen do seu intestino. As proteases de insetos mais bem estudadas são as serinoproteinases, muito freqüentes em várias classes e que se assemelham à tripsina e à quimotripsina de mamíferos (APPLEBAUM *et al.*, 1985).



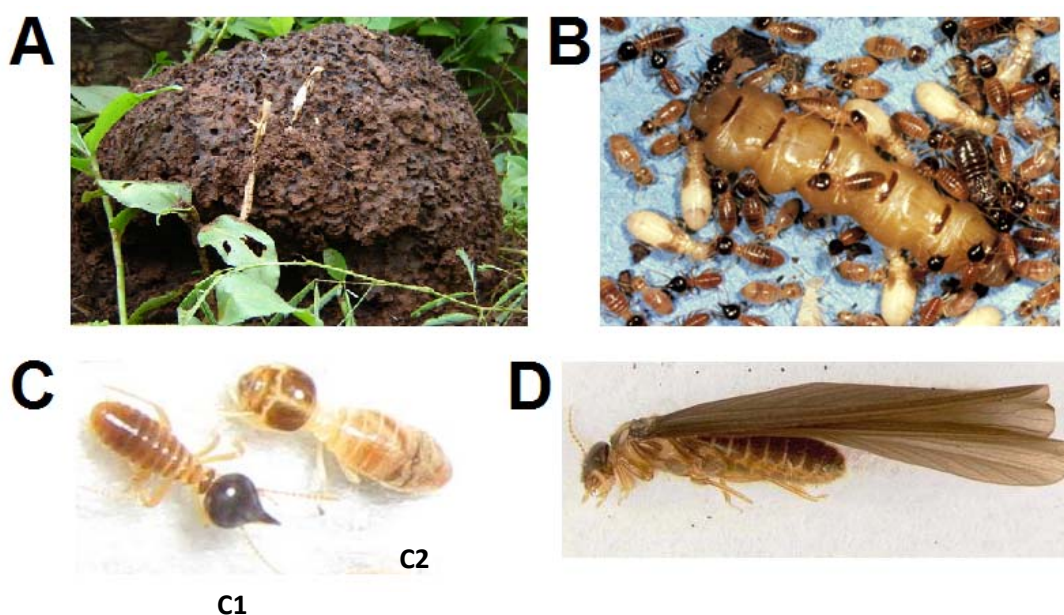
O sistema digestivo dos isópteros (Figura 3C) é considerado desenvolvido e geralmente ocupa uma ampla parte de seu abdome (KRISHNA & WEESNER, 1969), sendo composto por três partes: intestino anterior (estomodeum), intestino médio (mesenteron) e intestino posterior (proctodeum). Os indivíduos imaturos, os soldados e todos os reprodutores são incapazes de se alimentar sozinhos e recebem alimentação estomodeal ou proctodeal dos operários. A alimentação estomodeal pode ser saliva, que é o único nutriente dos reprodutores primários (rei e rainha) ou alimento regurgitado. Os soldados são, em grande parte, nutridos com alimento regurgitado, mas em algumas espécies da Família Termitidae eles têm uma dieta exclusivamente líquida (saliva). A alimentação proctodeal foi descrita para os cupins inferiores e consiste de excreções líquidas, ricas em simbioses, provenientes do intestino posterior e que são eliminadas em resposta a estímulos táteis de outros cupins (LIMA & COSTA-LEONARDO, 2007).

### **2.1.2 *Nasutitermes corniger***

*N. corniger* (Figura 4) é uma espécie de cupins amplamente distribuída nas Américas do Sul e Central (SCHEFFRAHN *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2007) e ocorre em quase todo o Brasil. Os soldados são caracterizados pela projeção na cabeça característica do gênero, denominada nasuto, por terem mandíbulas vestigiais e pela presença de uma glândula frontal que contém substâncias de defesa, incluindo vários tipos de terpenóides (CHUAH *et al.*, 1989) e proteínas (HOJO *et al.*, 2005). As colônias são formadas por múltiplos ninhos escuros e de superfície rugosa, construídos em árvores ou solo e conectados por túneis (Figura 4A). A estrutura das colônias, assim como acontece com outras espécies de cupins, varia consideravelmente dentro de populações de *N. corniger*, sendo a maioria das colônias composta por famílias simples, com uma única rainha e um único rei (ATKINSON &

ADAMS, 1997). Os cupins que vivem em ninhos de uma mesma colônia não são agressivos entre si. Contudo, operários e soldados de *N. corniger* são agressivos com indivíduos de outras colônias, sendo travadas longas batalhas quando cupins de colônias vizinhas entram em contato (ADAMS & LEVINGS, 1987).

Os cupins do gênero *Nasutitermes* têm sido favorecidos pelo desequilíbrio ambiental, demonstrando acentuados sinais de nocividade. Por isso, têm sido considerados como uma nova ameaça aos centros urbanos. Esses cupins buscam preferencialmente as partes altas das edificações, sendo visíveis em telhados e forros (FIGUEIREDO, 2004). No Semi-Árido brasileiro, os *Nasutitermes* têm invadido o meio urbano, atacando móveis e estruturas de construções (PAES *et al.*, 2002). As espécies de *Nasutitermes* estão entre as mais abundantes que podem se alimentar de madeiras (MIURA *et al.*, 2000).



**Figura 4.** *Nasutitermes corniger*.

(A) Ninho. (B) Rainha. (C) Soldado (C1) e operário (C2). (D) Reprodutor alado.

Fotos: (A) Michele D.C. Silva. (B) Retirado de [www.chem.unep.ch](http://www.chem.unep.ch). (C) Thiago H. Napoleão. (D) James P. Cuda, University of Florida

Grupos de *N. corniger* foram encontrados atacando madeiras de caucho (*Micrandia* sp., Euphorbiaceae) e virola (*Virola surinamensis*, Myristicaceae) e descritos como tendo preferência pela região do cerne (ABREU *et al.*, 2002). Algumas madeiras como a da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), do louro-pardo (*Cordia trichotoma*), da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e do sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) demonstraram elevada resistência à ação de cupins de *N. corniger* (PAES *et al.*, 2002, 2007). Colônias de *N. corniger* também foram encontradas atacando estruturas de madeira de museus (BRAZOLIN *et al.*, 2004).

## 2.2. Enzimas digestivas em insetos

### 2.2.1. Celulases

Os carboidratos são nutrientes essenciais que fornecem a energia necessária tanto para o ótimo crescimento larval como para a manutenção da longevidade dos adultos na maioria dos insetos. Porém, o valor nutritivo dos carboidratos depende da disponibilidade de enzimas capazes de digerir carboidratos complexos a monômeros adequados para sua posterior absorção no intestino (DADD, 1985; TERRA *et al.*, 1996). A celulose é um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) (DE AZEVEDO & ESPÓSITO, 2004). As moléculas de celulose são orientadas ao acaso e têm a tendência de formar ligações de hidrogênio inter e intramolecular (ROWELL *et al.*, 2005). Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por ligações amorfas. Regiões cristalinas são formadas a partir do aumento da densidade do empacotamento (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação de celulose ou outros celoligosacarídeos até glicose. São conhecidos três tipos: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21). Embora a celulose seja a maior fonte de alimento para muitas espécies de insetos, muitos deles não são capazes de produzir celulasas e por isso dependem de microorganismos simbiontes, os quais produzem as enzimas celulolíticas. Porém, trabalhos recentes confirmam a produção de celulasas pelos próprios insetos, sendo encontrados genes que codificam celulasas em Lepidoptera (BYEON *et al.*, 2005), Coleoptera (LEE *et al.*, 2004) e Isoptera (TOKUDA *et al.*, 2002).

Estudos relataram que cupins inferiores *Neotermes koshunensis* produzem celulase em suas glândulas salivares (TOKUDA *et al.*, 2002). Em cupins superiores, atividade celulolítica tem sido detectada no intestino médio (SLAYTOR, 2000) e celulase foi purificada de cupins *Macrotermes mülleri*, espécie que necessita da presença de certos fungos para seu crescimento (ROULAND *et al.*, 1989).

A origem de celulasas produzidas por cupins do gênero *Nasutitermes* tem sido estudada. Endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase e exoglucanases produzidas pelos próprios insetos foram encontradas no intestino médio (90 %) e em menor quantidade nas glândulas salivares de *Nasutitermes walkeri* (HOGAN *et al.*, 1988). Em *Nasutitermes takasagoensis*, a expressão de RNA mensageiros de  $\beta$ -glucosidases endógenas foi detectada no epitélio do intestino médio (TOKUDA *et al.*, 1999).

Estudo revelou que *Nasutitermes exitiosus* é capaz de secretar sua própria celulase e não depende da sua flora intestinal para digerir celulose, uma vez que, mesmo após remoção da flora intestinal por alimentação com tetraciclina, foi detectada atividade celulolítica no intestino anterior (19 %), intestino médio (59 %), segmento misto (14 %) e intestino posterior (8 %) (O'BRIEN *et al.*, 1979). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o aparato celulolítico de outras espécies de *Nasutitermes* é formado por

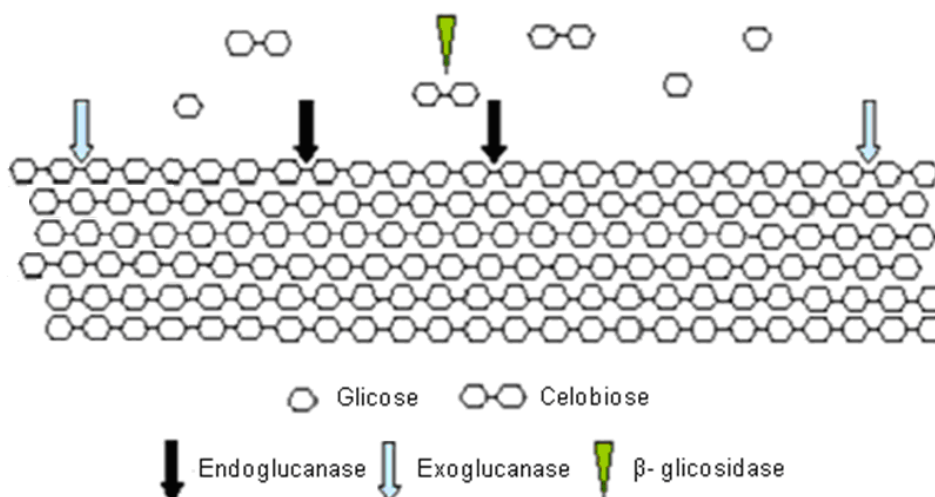
celulases endógenas e também de origem simbiótica. Estudos de metagenômica de espécies de *Nasutitermes* revelaram a presença de diversos genes para celulases em bactérias presentes no intestino posterior (WARNECKE *et al.*, 2007) e a atividade celulolítica no intestino posterior de *N. takasagoensis* foi reduzida significativamente após tratamento com antibiótico, sugerindo produção de celulases pelas bactérias simbiontes (TOKUDA & WATANABE, 2007). O envolvimento da atividade microbiana na degradação de celulose em *N. takasagoensis* pode ser atribuído à presença de complexos celulolíticos denominados “celulosomos”, que se encontram ancorados à parede celular bacteriana (TOKUDA *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1. Endoglucanases**

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose no interior da molécula de celulose (Figura 5), de forma aleatória, criando novas extremidades (SÁNCHEZ, 2009). Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). As regiões amorfas, com menor organização estrutural, são mais facilmente atacadas, pois suas cadeias não possuem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Assim, o ataque das endoglucanases leva a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose. A celulose cristalina e o algodão, substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam (MEDVE, 1997; ZANDONÁ FILHO, 2001).

### 2.2.1.2. Exoglucanases

Exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia de celulose (Figura 5), produzindo majoritariamente celobiose (dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose), além de glicose e celotriose (ZANDONÁ FILHO, 2001). O sítio ativo das exoglucanases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais (HUI *et al.*, 2002). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização.



**Figura 5.** Representação esquemática dos pontos de clivagem por endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases na estrutura da molécula de celulose.

### 2.2.1.3. β-glicosidases

As β-glicosidases, também denominadas celobíases, possuem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas exoglucanases e endoglucanases em glicose, completando a hidrólise da celulose (Figura 5). As β-glicosidases são extremamente importantes para a eficiência da

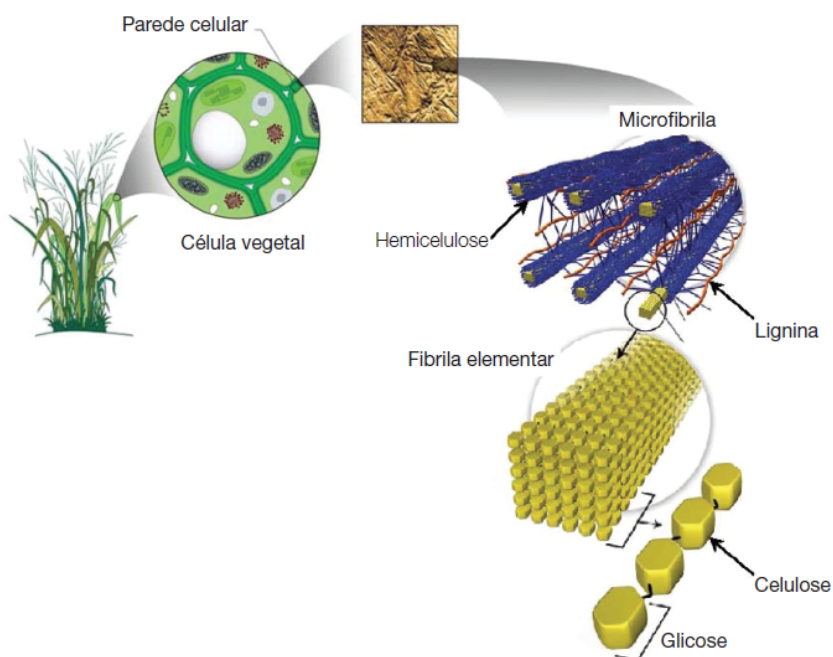
hidrólise da celulose por removerem do meio reacional a celobiose, que é um potente inibidor competitivo das exoglucanases (MEDVE, 1997; MUÑOZ *et al.*, 2001).

### 2.2.2. Hemicelulases

A parede celular dos vegetais é composta de microfibrilas de celulose que estão inseridas em uma matriz de polissacarídeos composta de hemiceluloses, pectina e lignina (TAIZ & ZEIGER, 2004; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008). As hemiceluloses são uma mistura de polímeros de pentoses e hexoses (como xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) bem como ácidos urônicos que fazem pontes de hidrogênio com a celulose envolvendo-a em uma rede, juntamente com a pectina (Figura 6). Esse recobrimento impede que as fibras paralelas de celulose colapsem entre si (BUCKERIDGE *et al.*, 2008; ROWELL, *et al.*, 2005).

Além da celulose, muitos insetos são capazes de digerir a fração hemicelulósica presente em seus alimentos. As hemicelulases são enzimas que hidrolisam a hemicelulose de maneira aleatória, produzindo oligossacarídeos lineares e ramificados. Devido à grande complexidade e heterogeneidade da rede hemicelulolítica, a sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas que atuam cooperativamente.

Para degradação das xilanas, em geral, é necessária a ação combinada de um conjunto de enzimas (Figura 7). As endo- $\beta$ -1,4-D-xilanases rompem ligações glicosídicas ao acaso produzindo grandes quantidades de xilo-oligossacarídeos substituídos e não-substituídos de diversos tamanhos. As exo- $\beta$ -1,4-D-xilanases rompem somente unidades de xilose a partir das extremidades da cadeia de xilana. As  $\beta$ -xilosidases hidrolisam sacarídeos como xilobiose e xilo-oligossacarídeos maiores até xilose (Figura 7B).



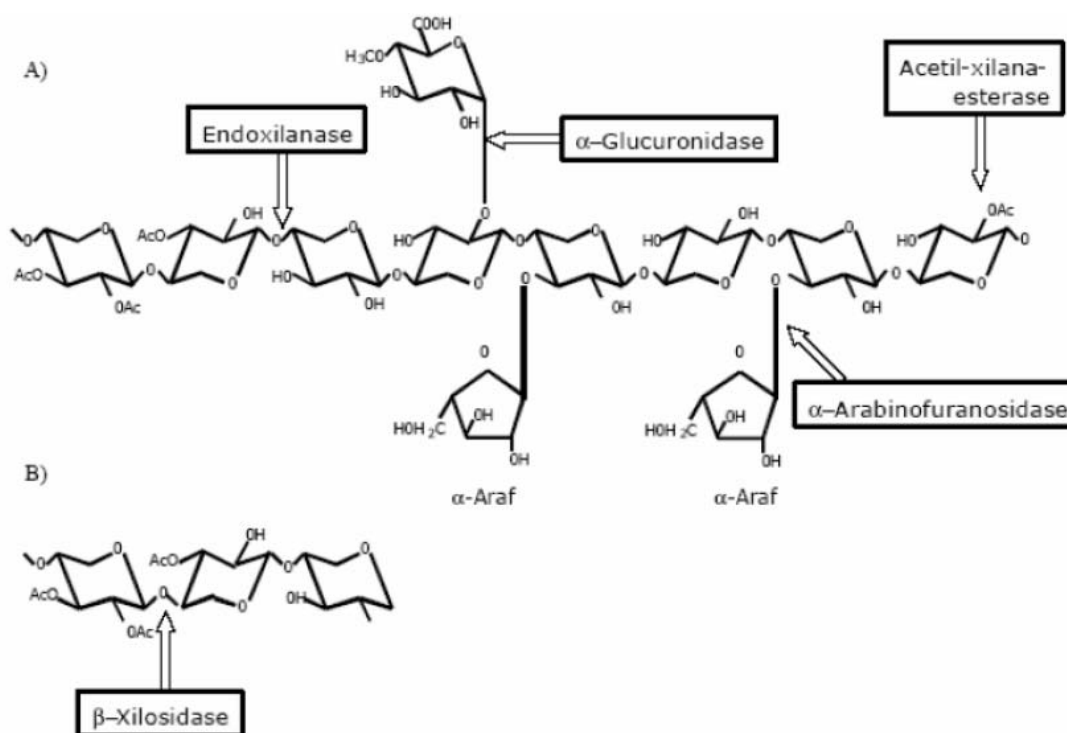
**Figura 6:** Arquitetura da parede celular vegetal.

Fonte: US Department of Energy Genome Programs <<http://genomics.energy.gov>>).

As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases hidrolisam terminais não-redutores de polissacarídeos contendo resíduos de L-arabinosil de cadeias laterais ou de arabinoxilanas, arabinana, goma arábica e arabinogalactana (Figura 7A). As  $\alpha$ -D-glucuronidasas atuam juntamente com manosidasas, mananases e outras enzimas para a degradação de polímeros como arabinogalactana e galactoglicomanana. As  $\alpha$ -D-glicuronidasas hidrolisam resíduos laterais de ácido glicurônico, as esterases de acetilxilana hidrolisam grupos acetil e as esterases de ácido ferúlico que hidrolisam resíduos de ácido ferúlico (SAHA, 2000; MOREIRA & FILHO, 2008).

Rouland *et al.* (1988) isolaram duas  $\beta$ -D-Xilanases de cupins operários da espécie *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae), uma a partir de extrato bruto do intestino do inseto, com atividade de 1,16 U/mg, e outra a partir de extrato bruto de somente seu microorganismo simbiote, o fungo *Termitomyces sp.*, cuja atividade foi 1,68 U/mg.





**Figura 7.** Mecanismo de ação enzimática de hemicelulases.

(A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. (B) Hidrólise de xilooligosacarídeos pela β-xilosidase. Ac: Grupo Acetil; α- Araf: α-arabinofuranose.

Fonte: ALMEIDA, 2009.

### 2.2.3. α-Amilases

As α-amilases ou α-1,4-glucano-4-glucanohidrolases são um grupo de enzimas monoméricas com a função de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas (α-1,4) presentes no amido, glicogênio e outros carboidratos. As amilases são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento de muitos insetos; especialmente em insetos-praga que vivem em estoques de sementes e grãos ricos em amido, várias isoformas dessas enzimas são encontradas.

Muitos estudos têm sido realizados no intuito de desvendar o funcionamento das α-amilases (CHRISPEELS *et al.*, 1998; GROSSI-DE-SÁ & CHRISPEELS, 1997; SILVA *et al.*, 2000; BELLINCAMPI *et al.*, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; DOJNOV

*et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). A maioria das  $\alpha$ -amilases conhecidas são enzimas extracelulares e são metaloproteínas que contém pelo menos um átomo de cálcio por molécula e precisam deste metal para manter sua atividade e estabilidade (FISCHER & STEIN, 1960). Muitas delas são proteínas glicosiladas, mas a proporção de glicosilação em sua estrutura varia consideravelmente (PLANCHOT & COLONNA, 1994). Podem ter múltiplas formas, com padrões específicos em diferentes tecidos (DOANE *et al.*, 1975; BUONOCORE *et al.*, 1977; WARCHALEWSKI & TKACHUK, 1978; BROWN & JACOBSEN, 1982; STRUMEYER *et al.*, 1988). A presença de  $\alpha$ -amilases tem sido demonstrada no sistema digestivo de muitos insetos, incluindo membros das ordens Orthoptera, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (TERRA & FERREIRA, 1994).

#### 2.2.4. Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e podem ser classificadas de acordo com a região da molécula sobre a qual atuam, sendo denominadas exopeptidases quando hidrolisam ligações peptídicas nas regiões N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases), ou endopeptidases (ou proteinases) quando catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas (FRANCO *et al.*, 1999; SILVA JÚNIOR & DE SIMONE, 2001; DEVLIN, 2002). As proteases podem ser classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: serinoproteases, cisteinoproteases, asparticoproteases e metaloproteases. As três primeiras classes são definidas de acordo com o resíduo nucleofílico presente no sítio ativo que hidrolisa a ligação peptídica do substrato (HEDSTROM, 2002). Já as metaloproteases são assim denominadas porque seu mecanismo catalítico envolve um íon metálico (KLEINER & STETLER-STEVENSON, 1993).

Existem dois mecanismos importantes no controle das proteases: a síntese na forma de precursor inativo (zimogênio) e a complexação com inibidores de proteases após sua ativação (LASKOWSKI & QASIM, 2000). As serinoproteases tripsina, quimotripsina e elastase, por exemplo, são sintetizadas como os precursores tripsinogênio, quimotripsinogênio e pró-elastase, os quais são ativados no lúmen do intestino delgado por clivagem de seqüências peptídicas da extremidade NH<sub>2</sub> terminal de suas moléculas (DEVLIN, 2002).

Para crescerem e se desenvolverem, os insetos requerem os mesmos aminoácidos essenciais que os mamíferos, os quais são obtidos de uma dieta protéica. Para isso eles se alimentam dos mais diversos compostos orgânicos, tais como madeira, folhas, flores, túberos, néctar, sementes, animais vivos ou mortos, sangue, fungos e bactérias (MURDOCK e SHADE, 2002; FORTUNATO *et al.*, 2007). Essa plasticidade teria sido conferida pela diversidade de enzimas digestivas, incluindo as proteases, que podem ser encontradas no intestino médio desse grupo de organismos, conferindo-lhes as habilidades de consumir e utilizar com eficiência uma grande variedade de recursos alimentares (TERRA *et al.*, 1996). As proteases de insetos mais bem estudadas são as serinoproteases, que se assemelham à tripsina e à quimotripsina de mamíferos (APPLEBAUM *et al.*, 1985). As cisteinoproteases também são enzimas digestivas importantes para insetos da Ordem Coleoptera, como *Callosobruchus maculatus* e *Acanthoscelides obtectus* (XAVIER-FILHO *et al.*, 1992).

#### **2.2.4.1. Serinoproteases**

As serinoproteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos, e se caracterizam por apresentarem em seu sítio ativo uma tríade catalítica composta por um resíduo de serina, um de histidina e um de ácido aspártico. Entre as representantes mais conhecidas dessa classe estão a tripsina e a quimotripsina (MARES-

GUIA & SHAW, 1965). De acordo com similaridades estruturais, as serinoproteases de eucariotos e procariotos são agrupadas em cinco famílias, as quais são subdivididas em seis clãs de ancestrais comuns: o clã A, que agrupa enzimas que possuem origem comum com a quimotripsina; o clã B com a subtilisina; o clã C com as carboxipeptidases; o clã E com a peptidase D-Ala-D-Ala de *Escherichia coli*; o clã F com o repressor Lex A; e o clã G, que agrupa as serinoproteases dependentes de ATP (RAWLINGS *et al.*, 2006).

As serinoproteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com pH ótimo entre 7,0 e 11,0 (RAO *et al.*, 1998). A massa molecular, em geral, está na faixa de 18 a 35 kDa; entretanto, serinoproteases maiores foram encontradas em alguns organismos, como é o caso da bactéria *Serratia marcescens*, que apresenta uma serinoprotease de massa molecular 53 kDa (ROMERO *et al.*, 2001).

As serinoproteases participam de vários processos fisiológicos nos insetos, incluindo a digestão e a resposta à defesa das plantas, bem como na resposta imunológica, na sinalização e amplificação de sinais, na ativação de cascatas, na indução de peptídeos antimicrobianos, na atividade antimicrobiana e na ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (NAKAJIMA *et al.*, 1997; GORMAN *et al.*, 2000a, 2000b; MA & KANOST, 2000; GORMAN & PASKEWITZ, 2001; LEVY *et al.*, 2004).

As tripsinas são serinoproteases da família da quimotripsina (clã A) e estão envolvidas na fase inicial da digestão protéica, clivando ligações peptídicas internas preferencialmente envolvendo aminoácidos básicos, com uma preferência para Arg sobre Lys de 2 a 10 vezes (CRAIK *et al.*, 1985; BARRETT *et al.*, 2004; RAWLINGS *et al.*, 2006).

As tripsinas de insetos estudadas são semelhantes àquelas dos vertebrados no que diz respeito ao sítio catalítico e especificidade, apresentando seqüências homólogas nas regiões do sítio catalítico (DAVIS *et al.*, 1985; KALHOK *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 1993). Porém, as tripsinas desses dois grupos diferem em algumas outras propriedades. Por exemplo,

as tripsina de insetos geralmente não são afetadas por íons cálcio (LEMOS & TERRA, 1992), são freqüentemente instáveis em pH ácido (MILLER *et al.*, 1974; JANY *et al.*, 1978) e tipicamente contêm menos pares de cisteína em suas seqüências que as tripsinas de vertebrados (MULLER *et al.*, 1993).

As tripsinas de todos os insetos possuem especificidade primária semelhante, com exceção daquelas de lepidópteras. Geralmente, essas proteases hidrolisam mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P<sub>1</sub>, mas as tripsinas de Lepidoptera possuem maior especificidade por substratos que contenham Lys (LOPES *et al.*, 2004, 2006). Inibidores de proteases produzidos por plantas apresentam uma região denominada sítio reativo, a qual interage com o sítio ativo da enzima-alvo. O alinhamento de seqüências de vários inibidores de proteases de plantas indicou que os sítios reativos da maior parte desses inibidores possuem um resíduo Lys na posição P<sub>1</sub>. A presença de Lys na posição P<sub>1</sub> no sítio reativo é considerada uma estratégia de sobrevivência das plantas, pois esses inibidores seriam resistentes à hidrólise pelas tripsinas de insetos, que hidrolisam preferencialmente Arg nessa posição (LOPES *et al.*, 2004).

Outras similaridades entre tripsina de insetos e tripsina bovina estão relacionadas com o mecanismo catalítico. Entretanto, a comparação de tripsinas de pâncreas bovino e tripsinas de insetos tem apontado diferenças nos valores de pH ótimo e massa molecular (PURCELL *et al.*, 1992) e na sensibilidade a inibidores de proteases de plantas (CHRISTELLER & SHAW, 1989).

As calicreínas constituem um grupo de serinoproteases que possuem sítio ativo semelhante ao da tripsina, ou seja, constituído de um subsítio aniônico, responsável pela ligação do substrato através da atração eletrostática ao seu nitrogênio carregado positivamente, um subsítio hidrofóbico, que liga a cadeia lateral carbonada dos resíduos arginil ou lisil, e o sítio catalítico propriamente dito, que contém um resíduo seril e histidil

(MARES-GUIA & DINIZ, 1967). Apesar da semelhança com tripsinas, as calicreínas não têm sido reportadas em sistemas digestivos de insetos e outros animais. As calicreínas estão geralmente implicadas na via intrínseca da coagulação e na vasodilatação direta e indireta, pois agem sobre o bradicinogênio clivando-o em plasmacinas, principalmente bradicinina e calidina, que são potentes vasodilatadores.

As quimotripsinas clivam preferencialmente as cadeias polipeptídicas do lado da carboxila de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, triptofano e tirosina (BARRETT *et al.*, 2004). Enzimas quimotripsina-símile são compostas por dois domínios  $\beta$ -barril justapostos, com os resíduos catalíticos formando pontes entre os barris (BAZAN & FLETTERICK, 1990). As quimotripsinas são bem descritas e purificadas de diversas espécies de insetos das ordens Diptera (VIZIOLI *et al.*, 2001; RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2003), Hymenoptera (JANY *et al.*, 1974; WHITWORTH *et al.*, 1998), Orthoptera (SAKAL *et al.*, 1988), Dictyoptera (BAUMANN, 1990), Coleoptera (ALARCON *et al.*, 2002; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2004; ELPIDINA *et al.*, 2005) e Lepidoptera (PETERSON *et al.*, 1995; HEGEDUS *et al.*, 2003; VOLPICELLA *et al.*, 2006).

A queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns, como tripsina e pepsina, por conter uma grande quantidade de pontes dissulfeto e de hidrogênio, e de interações hidrofóbicas, e para isso existem enzimas específicas chamadas queratinases capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina (SAID & PIETRO, 2004; RIFFEL *et al.*, 2007). Certos microorganismos e insetos sintetizam queratinases para digerir a queratina proveniente da dieta alimentar (LIN *et al.*, 1992).

### 2.2.5. Aplicações biotecnológicas de enzimas digestivas

Enzimas envolvidas no processo de digestão de diversos organismos apresentam as mais diversas aplicações biotecnológicas. Com o avanço da biologia molecular e técnicas de genômica e proteômica, essas enzimas podem ser isoladas e seqüenciadas, o que permite a clonagem e expressão em sistemas heterólogos, permitindo que as mesmas possam ser utilizadas em larga escala na indústria.

O uso de celulasas na indústria começou em 1980 como um aditivo na alimentação de animais (CHESSON, 1987). Posteriormente, essas enzimas passaram a ser utilizadas na indústria têxtil, bem como nas indústrias de celulose e papel (GODFREY & WEST, 1996). As celulasas têm atraído bastante interesse comercial devido às suas várias aplicações em áreas como: bioconversão de materiais celulósicos em açúcares solúveis, produção de fármacos, produção de detergentes, tratamento de efluentes e processamento de frutas e vegetais (MAMMA *et al.*, 2009). Na reciclagem de papel, essas enzimas atuam eficientemente removendo tintas de impressão da superfície de fibras recicláveis (JEFFRIES *et al.*, 1994). Na indústria têxtil, elas vêm sendo utilizadas com êxito no amaciamento (“*bio-stoning*”) de jeans e no polimento (“*bio-polishing*”) de algodão e de outras fibras celulósicas (KUHAD *et al.*, 1997; ANDREAUS *et al.*, 2000; MAGALHÃES, 2005). Nas indústrias citadas, a sacarificação extensiva da celulose não é desejada, mas sim uma ação superficial suficiente para gerar o efeito desejado (MARTINS, 2005).

Atualmente, os biocombustíveis gerados a partir de biomassa lignocelulósica têm recebido bastante atenção da indústria e de comunidades acadêmicas de todo o mundo, em consonância com o objetivo atual de promover economias sustentáveis e a preservação do meio ambiente. Assim, a utilização desses biocombustíveis é uma alternativa para reduzir a dependência por combustíveis fósseis. Nesse esforço, as indústrias têm encontrado um grande

desafio na conversão de biomassa em combustível, ainda de alto custo e pouco eficiente para produção em larga escala; dessa forma, tem crescido a busca por novas tecnologias viáveis e de baixo custo. Os sistemas lignocelulolíticos naturais, como, por exemplo, o de cupins e outros insetos que se alimentam de madeira, apresentam alta eficiência e são altamente especializados no processamento de biomassa lignocelulolítica, sendo considerados verdadeiros biorreatores naturais. Esses sistemas têm sido considerados importantes modelos a serem estudados para aplicação na tecnologia de produção de biocombustíveis e são compostos por celulasas e hemicelulasas. A descoberta dessas enzimas e seus genes correspondentes são importantes para que se possa entender o sistema celulolítico do inseto e avaliar seu potencial biotecnológico em aplicações industriais (SUN & SCHARF, 2010). Os avanços de ferramentas na pesquisa genômica e proteômica permitirão novos estudos sobre os mecanismos de degradação de madeira por insetos que se alimentam de celulose, bem como facilitar a descoberta de novas enzimas celulolíticas a partir de uma vasta gama de sistemas celulolíticos.

As amilases estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas para as indústrias que trabalham com amido. As amilases foram primeiramente utilizadas como remédio para distúrbios digestivos, em 1984. No cenário atual, as amilases são aplicadas na indústria alimentícia, de detergentes, têxtil e na indústria de papel para hidrólise do amido. Diferentes preparações de amilase são disponibilizadas pelos fabricantes de enzimas para uso específico em indústrias variadas (GODFREY & WEST, 1996; AEHLE & MISSET, 1999).

As proteases apresentam diversas aplicações biotecnológicas, sendo utilizadas como constituintes de detergentes, no processamento de couro, na produção de plásticos biodegradáveis, na indústria farmacêutica, no processo de coagulação de leite, na maturação de carnes e na síntese enzimática de adoçantes (CARVALHO, 2010). As tripsinas possuem muitas aplicações bioquímicas e industriais, por possuírem alta especificidade, permitindo



uma proteólise controlada. As proteases apresentam diversas vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais, pois possuem alta atividade catalítica, alto grau de especificidade pelo substrato, podem ser produzidas em larga escala e são economicamente viáveis e biodegradáveis (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998; ESPÓSITO, 2006).

### **2.2.6. Enzimas digestivas como alvos para controle de insetos**

Com o objetivo de controlar a população de insetos-praga, tem crescido a busca por novos métodos que utilizem compostos naturais em lugar dos agroquímicos sintéticos que são largamente utilizados. Uma das fontes desses compostos são plantas resistentes ao ataque de insetos. As plantas, diferentemente dos animais, não possuem sistemas imunológicos para enfrentar certas situações adversas. Esse fato, associado à sua imobilidade, fez com que elas desenvolvessem, ao longo do tempo, estratégias de defesa tanto pré-formadas quanto induzidas (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). Para minimizar o efeito dos ataques de insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa incluindo barreiras físicas, tais como espinhos, acúleos e caules rígidos (KENNEDY & BARBOUR, 1992), e barreiras químicas como: substâncias voláteis para a atração de predadores de insetos herbívoros, metabólitos secundários e proteínas defensivas, como lectinas, inibidores de proteinases, inibidores de  $\alpha$ -amilase, proteínas inativadoras de ribossomos, canatoxina, quitinases e arcelinas.

A ingestão de inibidores de proteases de origem vegetal por insetos leva à inibição de enzimas proteolíticas, o que interfere na biodisponibilidade de aminoácidos para a biossíntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto; inibidores de tripsina são capazes de induzir a morte de insetos por prejudicarem a digestão e absorção de nutrientes (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; BHATTACHARYYA *et al.*, 2007).

Extrato de flores de *Moringa oleifera* com atividade larvívica sobre larvas de *Aedes aegypti* e contendo inibidor de tripsina foi capaz de reduzir em 98% a atividade de tripsina no intestino das larvas após aproximadamente 5 horas de incubação (PONTUAL *et al.*, 2012).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase de natureza protéica são encontrados em microorganismos, plantas e animais (RYAN, 1990; IULEK *et al.*, 2000). Inibidores de  $\alpha$ -amilase, principalmente aqueles isolados de cereais, inibem as  $\alpha$ -amilases dos tratos intestinais dos insetos (GRANT *et al.*, 1995; VALENCIA *et al.*, 2000), o que permite supor que os inibidores dessas enzimas digestivas possam desempenhar um papel protetor diante o ataque de insetos (MENDIOLA-OLAYA *et al.*, 2000). Os inibidores de  $\alpha$ -amilases são altamente específicos para suas enzimas alvo, portanto a validade das  $\alpha$ -amilases como alvo do controle de insetos é dependente do entendimento claro da expressão das diferentes isoformas dessas enzimas no trato intestinal do inseto (FRANCO *et al.*, 2002).

Lectinas de plantas com atividade inseticida podem interferir na atividade de enzimas digestivas, por se ligarem a regiões glicosiladas da enzima, por se ligarem aos substratos ou por se ligarem ao complexo enzima-substrato (MACEDO *et al.*, 2007).

Nesse sentido é importante conhecer a fisiologia dos insetos-alvo, bem como da microbiota associada ao trato digestivo, uma vez que o conhecimento do aparato enzimático presente no trato digestivo do inseto pode direcionar a utilização de inseticidas naturais específicos, bem como contribui para a elucidação dos mecanismos de ação inseticida (FRANCO *et al.*, 2002).

### 2.3. Lectinas inseticidas

As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que apresentam um ou mais domínios ligantes a carboidratos, os quais podem interagir

específica e reversivelmente com monossacarídeos e glicoconjugados através de pontes de hidrogênio e ligações de van der Waals (PAIVA *et al.*, 2012). Em geral, as lectinas podem ser encontradas e isoladas dos mais diversos tecidos de uma planta, tais como folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), raízes (SOUZA *et al.*, 2011), rizomas (SANTANA *et al.*, 2012), entrecasas (SÁ *et al.*, 2009; VAZ *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012) e flores (SANTOS *et al.*, 2009); porém, a maior parte é encontrada em sementes (SANTOS *et al.*, 2009). Nas plantas, as lectinas têm um papel fisiológico que tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Hoje já se conhece alguns desses papéis como: (1) ativação de enzimas (KESTWAL *et al.*, 2007), (2) participação no mecanismo de nodulação em leguminosas (LIMPENS & BESSELING 2003) e (3) defesa contra microorganismos e insetos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

A atividade inseticida de lectinas de plantas contra diversas espécies de insetos de diferentes ordens, tem sido descrita tais como Coleoptera, Diptera, Homoptera, Lepidoptera e Isoptera (PAIVA *et al.*, 2011a). Esta propriedade estimula a avaliação do uso das lectinas de plantas como agentes inseticidas naturais contra pestes que causam prejuízos à produção agrícola e danos à saúde humana (MACEDO *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação inseticida das lectinas de plantas não está completamente elucidado. Tem sido sugerido que a resistência à degradação por proteases e a ligação a glicoconjugados da superfície de células epiteliais do intestino do inseto sejam dois pré-requisitos básicos para as lectinas exercerem seus efeitos deletérios, interferindo nas funções digestivas, protetoras ou secretórias do intestino (PUSZTAI & BARDOCZ, 1996). Outro efeito descrito é a desestabilização do metabolismo do inseto devido à interferência das lectinas nas funções enzimáticas pela ligação às porções glicosiladas das enzimas digestivas dos insetos (PAIVA *et al.*, 2012). As lectinas de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Canavalia*

*ensiformes* (Con A) afetaram as atividades das enzimas solúveis e de membrana do intestino médio de larvas de *Lacanobia oleracea*. Além disso, ocorreu o aumento da atividade das enzimas aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase (FITCHES & GATEHOUSE, 1998). Zhu-Salzman et al. (1998) analisaram, por mutagênese sítio-dirigida, a estrutura/função da lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSII) e suas formas mutantes, e concluíram que a atividade inseticida dessas proteínas contra larvas no terceiro e quarto instar de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) está correlacionada com a resistência à degradação proteolítica pelas enzimas do intestino médio e ligação ao trato digestivo

Lectinas ligadoras de quitina têm sido estudadas como agentes inseticidas, e essa atividade tem sido atribuída à ligação desta lectina a matriz peritrófica. Lectinas que se ligam à quitina podem afetar indiretamente o mecanismo regulatório das enzimas por perturbarem a síntese e integridade da matriz peritrófica (FITCHES & GATEHOUSE, 1998). A matriz peritrófica (MP) é um finíssimo envelope membranoso que recobre o bolo alimentar no intestino da maioria dos insetos. Ela está organizada num arranjo de quitina (4-13%) em uma matriz de proteína (21-51%) e carboidratos (RICHARDS & RICHARDS, 1997). As proteínas estruturais da MP estão principalmente associadas com as fibras de quitina por ligações não covalentes via domínios de ligação à quitina. A presença de múltiplos domínios ligantes de quitina nas proteínas da MP torna possível a formação de uma estrutura membranosa semelhante a um gel sustentado pelas fibras de quitina. Os domínios ligantes de quitina são ricos em cisteína e a presença de ligações dissulfeto contribui para a estabilidade (WANG *et al.*, 2001). Dentre as principais funções atribuídas a esta estrutura estão a proteção mecânica contra injúrias; a formação de uma barreira física contra microorganismos; o funcionamento como uma barreira de seletividade para as enzimas digestivas e produtos da digestão; e a atuação no mecanismo e conservação das enzimas digestivas (TERRA, 2001).

Lectinas isoladas da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folha (MuLL) de *M. urundeuva*, do líquen *Cladonia verticillaris* (ClaveLL), das raízes secundárias de *Bauhinia monandra* (BmoRoL), de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (OfiL) e da entrecasca de *Crataeva tapia* (CrataBL) apresentaram atividade inseticida contra operários e soldados de *N. corniger* (SÁ *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011b; SOUZA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012).

### 2.3.1. Lectinas de *Myracrodruon urundeuva*

A aroeira-do-sertão (*M. urundeuva*), que está inclusa na família Anacardiaceae, é uma espécie arbórea tropical de ampla distribuição geográfica, ocorrendo de 3°30'S (Brasil) a 25°S (Argentina), sendo também encontrada na Bolívia e no Paraguai. Do ponto de vista medicinal, todas as partes da planta aparecem com várias indicações. A infusão da casca do caule é um dos remédios vegetais mais utilizados na medicina popular, com indicações para febres, hemoptises, bem como processos inflamatórios e infecciosos (úlceras, gastrites e diarreias). Os metabólitos secundários do cerne da madeira de *M. urundeuva* apresentam propriedades antioxidante, antifúngica, e repelente de térmitas. Por causa de suas diversas qualidades, é muito explorada e tornou-se escassa em todas as áreas de ocorrência (LEITE, 2002; SÁ *et al.*, 2008).

As lectinas isoladas de *M. urundeuva* (MuBL, MuHL e MuLL) são lectinas com afinidade por N-acetilglicosamina e ligadoras de quitina. Em SDS-PAGE, MuBL, MuHL e MuLL apresentaram massas moleculares de 14,0 kDa, 14,4 kDa, 14,2 kDa, respectivamente. As três lectinas apresentam diferentes características físico-químicas, tais como estabilidade em diferentes valores de pH e frente ao aquecimento a 100 °C, e interação diferencialmente com glicoproteínas e monossacarídeos. Todas apresentaram caráter básico e glicoprotéico,

porém com diferentes teores de carboidratos: 33% para MuLL, 16,6% para MuBL e 21% para MuHL (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

As lectinas de *M. urundeuva* também diferem quanto à potencialidade de suas atividades biológicas. MuBL, MuHL e MuLL apresentaram atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* no quarto estágio, sendo as concentrações letais necessárias para matar 50% das larvas de 0,125, 0,04 e 0,202 mg/ml, respectivamente (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

Quanto à atividade termiticida contra *N. corniger*, MuLL induziu a mortalidade total de operários e soldados em 7 e 9 dias, com  $CL_{50}$  para 4 dias de 0,374 e 0,432 mg/ml, respectivamente. MuBL, a uma concentração de 0,8 mg/ml promoveu a mortalidade de 100% de operários e soldados em 8 e 9 dias, com  $CL_{50}$  (4 dias) de 0,974 e 0,787 mg/ml, respectivamente. Para MuHL, a  $CL_{50}$  foi de 0,248 mg/ml para operários e de 0,199 mg/ml para soldados, após 4 dias. Ensaio conduzido para avaliar a resistência das lectinas de *M. urundeuva* ao ambiente proteolítico do intestino dos cupins demonstraram que as atividades hemaglutinantes de MuBL, MuHL e MuLL não foram afetadas pela incubação com extratos de intestino de *N. corniger* contendo atividade de tripsina; adicionalmente, as lectinas de *M. urundeuva* apresentaram efeitos bacteriostático e bactericida sobre simbiontes do intestino das térmitas (NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Detectar e caracterizar as atividades de celulasas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase), hemicelulasas ( $\beta$ -D-xilanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidade e  $\beta$ -xilosidase)  $\alpha$ -amilase, proteases totais e serinoproteases (tripsina-símile, quimotripsina-símile, calicreína-símile e tipo queratinase) em extratos de intestino de operários e soldados de *N. corniger*, bem como avaliar o efeito de lectinas termiticidas isoladas de *M. urundeuva* sobre as atividades enzimáticas detectadas.

#### 3.2. Específicos

- Obter extratos de intestino de operários e soldados de *N. corniger*.
- Determinar as atividades de celulasas dos tipos endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase nos extratos, utilizando carboximetilcelulose (CMC), Avicel e  $p$ -nitrofenil-glicopiranosídeo (pNPG) como substratos, respectivamente.
- Detectar a presença de atividade hemicelulolítica dos tipos  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -D-xilanase nos extratos, utilizando  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPX),  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNAraf) e xilana como substratos, respectivamente.
- Avaliar a presença de atividade de  $\alpha$ -amilase nos extratos utilizando amido solúvel como substrato.
- Quantificar a atividade de proteases totais nos extratos utilizando azocaseína como substrato.

- Avaliar o efeito de inibidores (PMSF, E-64, pepstatina A e EDTA) na atividade de proteases totais.
- Determinar as massas moleculares de proteases presentes nos extratos enzimáticos através de eletroforese em gel de poliacrilamida e zimografia.
- Avaliar a presença da atividade de serinoproteases dos tipos tripsina-símile, calicreína-símile, tipo queratinase e quimotripsina-símile nos extratos, utilizando N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginil-p-nitroanilida, H-D-prolil-phenilalanil-arginina-p-nitroanilida, N-succinil-alanil-alanil-alanil-p-nitroanilida e N-succinil-L-fenil-alanil-p-nitroanilida como substratos, respectivamente.
- Determinar o efeito da temperatura e do pH nas atividades enzimáticas detectadas.
- Isolar as lectinas de entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folha (MuLL) de *M. urundeuva* através de fracionamento salino e cromatografia em colunas de quitina, seguindo protocolos previamente estabelecidos.
- Avaliar os efeitos de MuBL, MuHL e MuLL sobre as atividades enzimáticas detectadas.



#### 4. REFERÊNCIAS

- ABE, T. Evolution of the life types in termites. In: KAWANO, S.; CONNELL, J.H.; HIDAKA, T. (Eds.), **Evolution, coadaptation, and biotic communities**, University of Tokyo Press, Tokyo, p.128-148, 1987.
- ABREU, R. L. S.; SALES-CAMPOS, C.; HANADA, R. E.; VASCONCELLOS, F. J.; FREITAS, J. A. Avaliação de danos por insetos em toras estocadas em indústrias madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6, p. 789-796, 2002.
- ADAMS, E. S.; ATKINSON, L.; BULMER, M. S. Relatedness, recognition errors, and colony fusion in the termite *Nasutitermes corniger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, n. 8, p. 1195-1201, 2007.
- ADAMS, E. S.; LEVINGS, S. C. Territory size and population limits in mangrove termites. **Journal of Animal Ecology**, v. 56, n. 3, p. 1069-1081, 1987.
- AEHLE, W.; MISSET, O. Enzymes for industrial applications. In: REHM H. J., REED G. (Eds.), **Biotechnology**, 2. ed. Germany: Wiley-VCH, pp. 189-216, 1999.
- ALARCO'N, F.J., MARTÍNEZ, T.F., BARRANCO, P., CABELLO, T., DÍAZ, M., MOYANO, F.J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera:Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 265-274, 2002.
- ALMEIDA, M.N. **Celulases e Hemicelulases de espécies de *Acremonium* endofíticas**. 2009. Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ANDERSON, J.M.; WOOD, T.G. Mound composition and soil modification by two soil-feeding termites (Termitinae, Termitidae) in a riparian Nigerian forest. **Pedobiologia**, v. 26, n. 2, p. 77-82, 1984.
- ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P.; CAVACO-PAULO, A. Dry action of *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fabrics. **Journal of Society of Dyers and Colourists**, v. 116, p. 121-125, 2000.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases. A Review. **Bioresource Technology**, v. 6, n. 3, p. 175-183, 1998.

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of Digestion. In: KERKUT, G. A. & GILBERT, L.I. (Eds.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. New York, v. 4, p. 279- 311, 1985.

ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V., PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

ATKINSON, L.; ADAMS, E. S. The origins and relatedness of multiple reproductive colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 264, p. 1131-1136, 1997.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOSNER, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

BAUMANN, E. Isolation and partial characterization of a chymotrypsin-like endoprotease from cockroach intestinal system. **Insect Biochemistry**, v.20, p.761–768, 1990.

BAZAN, J.F, FLETTERICK, R.J. Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. **Seminars in Virology**, v. 1, p.311–322, 1990.

BEGUIN, P.; MILLET, J.; CHAUVAUX, S.; SALAMITOU, S.; TOKATLIDIS, K.; NAVAS, J.; FUJINO, T.; LEMAIRE, M.; RAYNAUD, O.; DANIEL, M.K. Bacterial cellulases. **Biochemistry Society Transactions**, v. 20, p. 42–6, 1992.

BELLINCAMPI, D.; CAMARDELLA, L.; DELCOUR, J.A.; DESSEAUX, V.; D'OVIDIO, R.; DURAND, A.; ELLIOT, G.; GEBRUES, K.; GIOVANE, A.; JUGE, N. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. **BBA - Proteins & Proteomics**, v. 1696, p. 265–274, 2004.

BERTI FILHO, E. Cupins e florestas. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Coord.). **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba: FEALQ, p. 127-140, 1995.

BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 669-677, 2007.

BIGNELL, D.E.; EGGLETON, P. Termites in ecosystems. In: ABE, T., BIGNELL, D.E., HIGASHI, M. (Eds.), **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. London: Kluwer Academic Publishers, pp. 363-387, 2000.

BRAZOLIN, S.; LELIS, A. T.; LOPEZ, G. A. C.; GUIMARÃES, F. P. O problema de fungos e insetos xilófagos no museu de arte sacra de Salvador–BA. Associação Brasileira de Conservadores-Restauradores de Bens Culturais– Textos técnicos 2004. Disponível em: [http://www.abracor.com.br/novosite/pdfs/insetos\\_museu\\_arte\\_sacra.pdf](http://www.abracor.com.br/novosite/pdfs/insetos_museu_arte_sacra.pdf). Acesso em: 28 out. 2010.

BRESNAK, J.A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites, **Annals Review Entomology**, v. 39, p. 453–487, 1994.

BROWN, A.H.D.; JACOBSEN, J.V. Genetic basis and natural variation of alpha-amylase isozymes in barley. **Genetics Research**, v. 40, n. 3, p. 315– 324, 1982.

BUCKERIDGE, M.S., CAVALARI, A.A. & SILVA, G.B. 2008b. Parede Celular. In *Fisiologia Vegetal* (G.B. Kerbauy, ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.165-168.

BUONOCORE, V.; DEPONTE, R.; GRAMENZI, F.; PETRUCCI, T.; POERIO, E.; SILANO, V. Purification and properties of alpha-amylase from chicken (*Gallus gallus* L.) pancreas. **Cell Biochemistry**, v. 17, p. 11 – 15, 1977.

BYEON, G.M.; LEE, K.S.; GUI, Z.Z.; KIM, I.; KANG, P.D.; LEE, S.M.; SOHN, H.D.; JIN, B.R. A digestive  $\beta$ -glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 141, p. 418-427, 2005.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 15-39, 2002.

CARVALHO, B. E. A. **Atividades caseinolítica, endopeptidásica e coagulante de leite em flores de *Moringa oleifera* Lam.** Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas / Bacharelado), Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: HARESIGN, W.; COLE D.J.A. (Eds.), **Recent advances in animal nutrition**. London: Butterworths, pp. 71–89, 1987.

CHRISPEELS, M.J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; HIGGINS, T.J.V. Genetic engineering with  $\alpha$ -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**, v. 8, p. 257-263, 1998.

CHRISTELLER, J.T.; SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. **Insect Biochemistry**, v. 19, p. 233-241, 1989.

CHUAH, C. H.; GOH, S. H.; THO, Y. P. Interspecific variation in defense secretions of Malaysian termites from the genus *Nasutitermes* (Isoptera, Nasutiterminae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 2, p. 549-563, 1989.

CLEVELAND, L.; HALL, S.R.; SANDERS, E.P; COLLIER, J. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its Protozoa, and the symbiosis between Protozoa and roach. **Memory American Academy of Arts & Science**, v. 17, p. 185-342, 1934.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B.B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COLLINS, N. M. The utilization of nitrogen resources by termites (Isoptera). In: LEE, J.A.; Mc NEILL, S.; RORISON, I.H. (Eds.), **Nitrogen as an ecological factor**. Oxford: Oxford University Press, p. 381-412, 1983.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 40, n. 25, p. 387-448, 1999.

CONSTANTINO, R. On-Line Termites Database, 2007. Disponível em: <http://vsites.unb.br/ib/zoo/catalog.html>. Acesso em: 13 nov. 2010.

COSTA-LEONARDO, A.M. **Cupins-praga: morfologia, biologia e controle**. Edifurb Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2002.

CRAIK, C.S.; LARGMAN, C.; FLETCHER, T.; ROCZNIAK, S.; BARR, P.J.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W.J. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. **Science**, v. 228, p. 291-297, 1985.

DADD, R.H. Nutrition: organisms. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.), **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology 8**. Oxford: Pergamon Press, pp. 338–341, 1985.

DAVIS, C.A.; RIDDELL, D.C.; HIGGINS, M.J.; HOLDEN, J.J.A.; WHITE, B.N. A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 6605–6619, 1985.

DE AZEVEDO, J.L.; ESPÓSITO, E. **Fungos: Uma introdução á biologia, bioquímica e biotecnologia**. Editora Educs, Caxias do Sul. 510p. 2004.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 6-7, p. 593-602.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 5ª ed. São Paulo: Edgard B. Lúcher, 2002. p. 971-973.

DOANE, W.W.; ABRAHAM, I.; KOLAR, M.; MARTENSEN, R.E.; DEIBLER, G.E. Purified *Drosophila* alpha-amylase isozymes: genetical, biochemical, and molecular characterization. In: MARKERT, C.L. (Ed.), **Isozymes Genetics and Evolution**. Academic Press, New York, pp. 585–607, 1975.

DOJNOV, B.; BOZIC, N.; NENADOVIC, V.; IVANOVIC, J.; VUJCIC, Z. Purification and properties of midgut  $\alpha$ -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 149, p. 153–160, 2008.

ELPIDINA, E.N.; TSYBINA, T.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; BELOZERSKY, M.A.; ZHUZHNIKOV, D.P.; OPPERT, B. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Biochimie**, v. 87, p. 771–779, 2005.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó**. Dissertação de Mestrado (Recursos Pesqueiros e Aquicultura), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

FIGUEIREDO, L. R. *Nasutitermes*: uma nova ameaça para os grandes centros urbanos. **Boletim Bay Pro Profissional**, v. 3, p. 1, 2004.

FISCHER, E.H.; STEIN, E.A.  $\alpha$ -Amylases. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. (Eds.), **The Enzymes**, vol. 4. New York: Academic Press, pp. 126– 145, 1960.

FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.

FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxigenase-induced defence of soybean varieties to the attack of the velvet vean Caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Jounal of Pest Science**, v. 80,p. 241-247, 2007.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 11, p. 36-40, 1999.

FRANCO, O. L.; RIDGEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1988.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Stockton Press, pp. 91, 105-131, 192, 339-356, 361-371, 1996.

GORMAN, M. J.; ANDREEVA, O. V.; PASKEWITZ, S. M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 257-262, 2000a.

GORMAN, M. J., ANDREEVA, O. V., PASKEWITZ, S. M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene**, v. 251, p. 9-17, 2000b.

GORMAN, M. J.; PASKEWITZ, S. M. Serine proteases as mediators of mosquito immune response. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 257-262. 2001.

GRANT, G.; EDWARDS, E. J.; PUSZTAI.  $\alpha$ -Amylase inhibitors levels in seeds generally available in Europe. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 67, p. 235-238, 1995.

GRASSÉ, P.P. Ordre des Isoptères ou termites. In: GRASSÉ P.P. (Ed.), **Traité de zoologie**, v. 9. Paris: Masson, p.408-544, 1949.

GRASSÉ, P.P. **Termitologia: Comportement, socialité, écologie, évolution, systématique**, Tome III. Paris: Masson, p. 715, 1986.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. **Evolution of the Insects**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

GROSSI-DE-SÁ, M. F; CHRISPEELS, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.

GULLAN, P.J. **Os insetos: um resumo de entomologia**. In: GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. (Eds), com ilustrações de K. HANSEN MCINNES; [tradução de Sônia Maria Marques Hoenen], São Paulo: Rocca, 3º edição, pp 440, cap 1 e cap 7, 2007.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.), **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1102-1156, 2000.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemistry Reviews**, v. 102, p. 4501-4524, 2002.

HEGEDUS, D.; BALDWIN, D.; O'GRADY, M.; BRAUN, L.; GLEDDIE, S.; SHARPE, A.; LYDIATE, D.; ERLANDSON, M. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: characterization, cDNA Cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, p.30-47, 2003.

HIGHLEY, T.L.; KIRK, T.K. Mechanisms of wood decay and the unique features of heartrots. **Phytopathology**, v. 69, n.10, 1151-1157, 1979.

HOGAN, M.; VEIVERS, P.C.; SLAYTOR, M.; CZOLIJ, R.T. The site of cellulose breakdown in higher termites (*Nasutitermes walkeri* and *Nasutitermes exitiosus*). **Journal of Insect Physiology**, v. 34, p. 891-899, 1988.

HOJO, M.; KOSHIKAWA, S.; CORNETTE, R.; MATSUMOTO, T.; MIURA, T. Identification of soldier-caste specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 347-354, 2005.

HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v. 12, p. 837–849, 2002.

IULEK, J.; FRANCO, O. L.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C. T.; BLOCH Jr., C.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereal* (Rye). **International Journal Biochemistry Cell Physiology**, v. 32, p. 1195-1204, 2000.

JANY, K. D.; HAUG, H.; ISHAY, J. Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. **Insect Biochemistry**, v. 8, p. 221–230, 1978.

JANY, K.D.; PFLEIDER, G.; MOLITORI, H.P. Purification and some physical properties of a chymotrypsin-like protease of larva of hornet, *Vespa orientalis*. **European Journal of Biochemistry**, v.42, pp. 419–428, 1974.

JEFFRIES, T.; KLUNGNESS, J. H.; SYKES, M.; CROPSEY, K. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. **Tappi Journal**, v. 77, p. 173–177, 1994.

JL, R.; BRUNE, A. Digestion of peptidic residues in humic substances by an alkali-stable and humic-acid-tolerant proteolytic activity in the gut of soil-feeding termites. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1648-1655, 2005.

KALHOK, S. E.; TABAK, L. M.; PROSSER, D. E.; BROOK, W.; DOWNE, A. E. R.; WHITE, B. N. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 2, p. 71–79, 1993.

KAMBHAMPATI, S.; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Eds.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 1–23, 2000.

KENNEDY, G. G.; BARBOUR, J. D. Resistance variation in natural and managed systems. In: FRITZ, R. S.; SIMMS, E. L. (Eds.), **Plant Resistance to herbivores and pathogens**. Chicago: The University of Chicago Press, p. 13-41, 1992.

KESTWAL, R.M.; KONOZY, E.M.E.; HSIAO, C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BHIDE, S.V. Characterization of  $\alpha$ -mannosidase from *Erythrina indica* seeds and influence of endogenous lectin on its activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 24-28, 2007.



KIM, Y. H.; WOLOSHUK, C. P.; CHO, E. H.; BAE, J. M.; SONG, Y. S.; HUH, G. H. Cloning and functional expression of the gene encoding an inhibitor against *Aspergillus flavus*  $\alpha$ -amylase, a novel seed lectin from *Lablab purpureus* (*Dolichos lablab*). **Plant Cell**, v. 26, p. 395–405, 2007.

KLEINER, D.E.; STETLER-STEVENSON, W.G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 891-897, 1993.

KORB, J. Termites. **Current Biology**, v. 17, p. R995-R999, 2007.

KRISHNA, K.; WEESNER, F.M. Introduction. In: KRISHNA, K; & WEESNER, F.M. (Eds.), **Biology of termites**, v. 1. New York: Academic Press, p. 1-17, 1969.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), **Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 57. Berlin: Springer-Verlag, p. 45–126, 1997.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 324-337, 2000.

LEE, S.J.; KIM, S.R.; YOON, H.J.; KIM, I.; LEE, K.S.; JE, Y.H.; LEE, S.M.; SEO, S.J.; SOHN, H.D.; JIN, B.R. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 107-116, 2004.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, p. 193-206, 2002.

LEMOS, F. J. A.; TERRA, W. R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 613–619, 1992.

LENZ, M. Food resources, colony growth and caste development in wood-feeding termites. In: HUNT, J.H.; NALEPA, C.A. (Eds.), **Nourishment and evolution in insect societies**. Boulder: Westview Press, p. 159-210, 1994.

LEVY, F.; RABEL, D.; CHARLET, M.; BULET, P.; HOFFMANN, J.A.; EHRER-SABATIER, L. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. **Biochimie**, v. 86, p. 607-616, 2004.

LIMA, J. T.; COSTA-LEONARDO, A. M. Food resources exploited by termites (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropical**, v. 7, n. 2, p. 1676-0603, 2007.

LIN, X.; LEE, C.G.; CASALE, E.S.; SHIH, J.C.H. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3271–3275, 1992.

LIMPENS, E., BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LO, N.; TOKUDA, G.; WATANABE, H.; ROSE, H.; SLAYTOR, M.; MAEKAWA, H.; BANDI, C.; NODA, H. Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. **Current Biology**, v. 10, p. 801–804, 2000.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; TERRA, W.R. Co-evolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 55, p. 140-152, 2004.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; MARANA, S.R.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 130-140, 2006.

MA, C.; KANOST, M.R. A  $\beta$ 1, 3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7505-7514, 2000.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M., SILVA, M. B. R., COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, p. 486-498, 2007.

MAGALHÃES, P. O. **Purificação de hemicelulases e uma  $\beta$ -glicosidade de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação.** Tese de Doutorado (Biotecnologia), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena – SP, 2005.

MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D.; KEKOS, D.; STAMATIS, H.; KALOGERIS, E. Adsorption of major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* on cellulosic substrates. **World of Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 781–788, 2009.

MARES-GUIA, M.; DINIZ, C.R. Studies on the mechanism of rat urinary kallikrein catalysis, and its relation to catalysis by trypsin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 121, p. 750-756, 1967.

MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, p. 1579-1585, 1965.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba – PR, 2005.

MCMANUS, M.T.; BURGEES, E.P.J. Effects of soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 9, p.731-738, 1995.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanases II. **Tese de Doutorado**. Lund University, Department of Biochemistry, Lund, Sweden, 1997.

MENDIOLA-OLAYA, E.; VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; VALDÉS-RODRIGUEZ, S.; DÉLANO-FRIER, J.; BLANCO-LABRA, A. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 126, p. 425-433, 2000.

MEYER, J.R. Isoptera. Department of Entomology. NC State University, 2005. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/compendium/termites.html>. Acesso em 09 nov. 2010.

MILLER, J. W.; KRAMER, K. J.; LAW, J. H. Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 48, p. 117–129, 1974.

MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2000.

MOREIRA, L.R.S.; FILHO, E.X.F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 165-178, 2008.

MULLER, H. M.; CRAMPTON, J. M.; DELLA TORRE, A.; SINDEN, R.; CRISANTI, A. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. **EMBO Journal**, v. 12, p. 2891–2900, 1993.

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporum*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as a plant defense against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6605-6611, 2002.

MYLES, T. G. Termite biology, Urban Entomology Programme, 2005. Disponível em: <http://www.utoronto.ca/forest/termite/termite.html>. Acesso em: 24 out. 2010.

NAKAJIMA, Y.; TSUJI, Y.; HOMMA, K.; NATORI, S. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 23805-23810, 1997.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F.S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

O'BRIEN, G.W.; VEIVERS, P.C.; MCEWEN, S.E.; SLAYTOR, M.; O'BRIEN, R.W. The origin and distribution of cellulose in the termites, *Nasutitermes exitiosus* and *Coptotermes lacteus*. **Insect Biochemistry**, v. 9, p. 619-625, 1979.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T.; LEPAGE, E. S.; LOPEZ, G. A. C.; OLIVEIRA, L. C. S.; CAÑEDO, M. D.; MILANO, S. Agentes destruidores da madeira. In: **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo, p. 99-275, 1986.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J.A.N.; RIGDEN, D.J.; FRAGOSO, R.R.; SILVA, R.O.; GOMES, E.A.; FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; CORDEIRO, C.M.T.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.903–918, 2004.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p. 135-144, 2002.

PAES, J. B.; MELO, R. R.; LIMA, C. R.; OLIVEIRA, B. Resistência natural de sete madeiras ao cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.) em ensaio de preferência alimentar. **Revista Brasileira de Ciências Agrícolas**, v. 2, n. 1, p. 57-62, 2007.

PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal activity of lectins and secondary metabolites. In: PERVEEN, F. (Ed.), **Insecticides – Advances in integrated pest management**. Rijeka: InTech, 2011a, pp. 579-598.

PAIVA, P.M.G.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. In: POURALI, K.; RAAD, V.N. (Eds.), **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**. New York, Nova Science Publishers, Inc, 2012.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRA-NETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011b.

PEDROSA-MACEDO, J. H. Pragas florestais do sul do Brasil. **Manual de Pragas em Florestas**, v. 2. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993.

PETERSON, A.M.; FERNANDO, G.J.P.; WELLS, M.A. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca Sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p.765–774, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defence. **The Histochemical Journal**, v. 27, pp. 253-271, 1995.

PHILIP, H. Biology and Control of the Subterranean Termite. Pest Management Fact Sheet 98-01, 2004. Disponível em: <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/termite.htm>. Acesso em: 8 nov. 2010.

PLANCHOT, V.; COLONNA, P. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus fumigatus*. **Carbohydrate Research**, v. 272, p. 97-109, 1994.

PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; XAVIER, H.S.; NAVARRO, D.M.A.F.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, p. 135-152, 2012.

PRINS, R.A.; KREULEN, D.A. Comparative aspects of plant cell wall digestion in insects. **Animals Feed Science and Technology**, v. 32, p. 101-118, 1991.

PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.P.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 41-47, 1992.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 8, pp.149-165, 1996.

RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M.C.; VALENZUELA, J.G. Cloning and characterization of trypsin-and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p.163-171, 2003.

RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRET A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270-D272, 2006.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v.128, p.693-703, 2007.

RICHARDS, A. G.; RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. **Annual Review Entomology**, v. 22, pp. 219-240, 1997.

ROMERO, F. J.; GARCÍA, L. A.; SALAS, J. A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 507-515, 2001.

ROULAND, C.; LENOIR-ROUSSEAU, J. J.; MORA, P.; RENOUX, J. Origin of the exocellulase and the  $\beta$ -glucosidase purified from the digestive tract of the fungus-growing termite *Macrotermes muelleri*. **Sociobiology**, v. 15, p. 237-246, 1989.

ROULAND, C.; RENOUX, J.; PETEK, F. Purification and properties of two xylanases from *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. **Insect Biochemistry**, v.18, p.709-715, 1988.

ROWELL, M.R.; PETTERSEN, R.; HAN, J.S.; ROWELL, J.S.; TSHABALALA, M.A. Cell wall chemistry. In: **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. CRC Press, 487 p., 2005.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 460-464, 2008.

SÁ, R.A.; SANTOS, N.D.L.; SILVA, C.S.B.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; CAVADA, B.S.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SAHA, B.C.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 403-423, 2000.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 413p. 2004.

SAKAL, E.; APPLEBAUM, S.W.; BIRK, Y. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. **Internacional Journal of Peptide Research**, v.32, p. 590–598, 1988.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANTANA, G.M.S.; ALBUQUERQUE, L.P.; NAPOLEÃO, T.H.; SOUZA, S.R.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTINI, E. J. **Biodeterioração e preservação da madeira**. Santa Maria: UFSM/CEPEF/FATEC, pp. 125, 1988.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; ARGOLO, A.C.C.; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504–508, 2009.

SCHEFFRAHN, R. H; SU, N-Y. **Asian subterranean termite, *Coptotermes gestroi* (=havilandi) (Wasmann) (Insecta: Isoptera: Rhinotermitidae)**. EENY-128, Featured Creatures from the Entomology and Nematology Department, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2008.

SCHEFFRAHN, R. H.; KRECEK, J.; SZALANSKI, A. L.; AUSTIN, J. W. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 273-281, 2005.

SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; CHRISPEELS, M.J.; TOGAWA, R.C.; NESHICH, G. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between alpha-amylase and their inhibitors. **Protein Engineering**, v. 13, p. 101-111, 2000.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.



SILVA JUNIOR, F. P.; DE SIMONE, S. G. Proteases como alvos de quimioterapia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, p. 12-17, 2001.

SLAYTOR, M. Energy metabolism in the termite and its gut microbiota. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (Eds.), **Termites: Evolution, Society, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 307-332, 2000.

SORENSEN, J. F.; KRAGH, K. M.; SIBBESEN, O.; DELCOUR, J.; GOESAERT, H.; SVENSSON, B.; TAHIR, T. A.; BRUFAU, J.; PEREZ-VENDRELL, A. M.; BELLINCAMPI, D.; D'OVIDIO, R.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; BONNIN, E.; JUGE, N. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 275–287, 2004.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

STRUMEYER, D. H.; KAO, W.; ROBERTS, T.; FORSYTH-DAVIS, D. Isozymes of  $\alpha$ -amylase in the porcine pancreas: population distribution. **Comparative Biochemistry Physiology, Part B**, v. 91, p. 351–357, 1988.

SUN, J-Z.; SCHARF, M.E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Insect Science**, v. 17, p. 163–165, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução: SANTARÉM, E.R. *et al.* Editora Artmed, 3ª edição, 722p. 2004.

TAYASU, I.; ABE, T.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D.E. Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. **Ecological Entomology**, v. 22, n. 3, p. 343-351, 1997.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, pp. 47-61, 2001.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E. Digestive enzymes. In: LEHANE, M. J. & BILLINGSLEY, P. F. (Ed). **Biology of the Insect Midgut**. Cambridge: Chapman & Hall, The University Press, p. 206-235, 1996.

THOMPSON, G. Termites. Tropical Topics News Letter, **Tropical Savanna**, n. 64, Australia, 2000.

THORNE, B. L.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Early fossil history of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (EDS.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 77–93, 2000.

TOKUDA, G.; LO, N.; WATANABE, H.; SLAYTOR, M.; MATSUMOTO, T.; NODA, H. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1447, p. 146-159, 1999.

TOKUDA, G.; SAITO, H.; WATANABE, H. A digestive  $\beta$ -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1681-1689, 2002.

TOKUDA, G.; LO, N.; WATANABE, H. Marked variations in patterns of cellulase activity against crystalline- vs. carboxymethyl-cellulose in the digestive systems of diverse, wood-feeding termites. **Physiological Entomology**, v. 30, p. 372-380, 2005.

TOKUDA, G.; WATANABE H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. **Biological Letters**, v. 3, p. 336-339, 2007

VALENCIA, J.A.; BUSTILLO, A.E.; OSSA, G.E.; CHRISPEELS, M.J.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 207-213, 2000.

VAZ, A.F.M.; COSTA, R.M.P.B.; MELO, A.M.M.A.; OLIVA, M.L.V.; SANTANA, L.A.; SILVA-LUCCA, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1507-1513, 2010.

VIZIOLI, J.; CATTERUCCIA, F.; DELLA TORRE, A.; RECKMANN, I.; MULLER, H.M. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 4027–4035, 2001.

VOLPICELLA, M.; CORDEWENER, J.; JONGSMA, M.A.; GALLERANI, R.; CECI, L.R.; BEEKWILDER, J. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. **Journal of Chromatography B**, v. 833, pp. 26–32, 2006.

WALLER, D.A; LA FAGE, J.P. Nutritional ecology of termites. In: SLANSKY Jr., F.; RODRIGUEZ, J. G. (Eds.), **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: John Wiley & Sons, p.487-532, 1986.

WANG, J.; DING, M.; LI, Y.H.; CHEN, Q.X.; XU, G.J.; ZHAO, F.K. Isolation of a multifunctional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crosseana*. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)**, v. 35, p. 941–946, 2003.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, pp. 110-118, 2001.

WANG, J. R.; WEI, Y. M.; LONG, X. Y.; YAN, Z. H.; NEVO E.; BAUM, B. R.; ZHENG, Y. L. Molecular evolution of dimeric  $\alpha$ -amylase inhibitor genes in wild emmer wheat and its ecological association. **BMC Evolution Biology**, v. 8, p. 91–105, 2008.

WARCHALEWSKI, J.R.; TKACHUK, R. Drum wheat alpha-amylase. Isolation and purification. **Ceramics Chemistry**, v. 55, p. 145– 156, 1978.

WARNECKE F.; LUGINBÜHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T. H.; STEGE, J. T.; CAYOUE, M.; MCHARDY, A. C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S. G.; PODAR, M.; MARTIN, G. H.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; PLATT, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; BARRY, K.; MIKHAILOVA, N.; KYRPIDES, N. C.; MATSON, E. G.; OTTESSEN, E. A.; ZHANG, X.; HERNÁNDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L. G.; RIGOUTSOS, I.; TAMAYO, G.; GREEN, B. D.; CHANG, C.; RUBIN, E. M.; MATHUR, E. J.; ROBERTSON, D. E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J. R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, p. 560-565, 2007.

WHITWORTH, S.T.; BLUM, M.S.; JAMES, T. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta*. Isolation and characterization of four serine endopeptidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273 n° 23, pp.14430–14434, 1998.

WOOD, T.M. Fungal cellulases. **Biochemistry Society Transactions**, v. 20, p. 46–53, 1992.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1992.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. Tese de Doutorado (Processos Biotecnológicos). Universidade do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR, 2001.

ZANETTI, R. **Manejo integrado de cupins**. Lavras: UFLA, 2002.

ZAVALA, J.A.; PATANKAR, A.G.; GASE, K.; HUI, D.; BALDWIN, I.T. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1181-1190, 2004.

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R.E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.A.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, I.A.; HASEGAWA, P.M.; MURDOCK, L.L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. **Proceedings of National Academy Sciences USA**, v. 95, pp. 15123–15128, 1998.

ZORZENON, F. J.; POTENZA, M. R. (Coord.). **Cupins: pragas em áreas urbanas**. São Paulo: Instituto Biológico, Boletim Técnico 10, p. 46, 1998.

## 5. ARTIGO

### **CELLULASE, HEMICELLULASE, $\alpha$ -AMYLASE AND PROTEASE ACTIVITIES FROM *Nasutitermes corniger* GUT: DETECTION, CHARACTERIZATION AND MODULATION BY TERMITICIDAL LECTINS**

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Insect Biochemistry and Molecular Biology”



Fator de Impacto: 4.018

**Cellulase, hemicellulase,  $\alpha$ -amylase and protease activities from *Nasutitermes corniger* gut: detection, characterization and modulation by termiticidal lectins**

Thâmarah de Albuquerque Lima<sup>a</sup>, Emmanuel Viana Pontual<sup>a</sup>, Leonardo Prezzi Dornelles<sup>a</sup>, Rodrigo da Silva Ferreira<sup>b</sup>, Poliana Karla Amorim<sup>a</sup>, Maria Luiza Vilela Oliva<sup>b</sup>, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho<sup>a</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>a</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Vila Clementino, 04044-020, São Paulo-SP, Brazil.*

**\*Corresponding author.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

**Abstract**

*Nasutitermes corniger* is a termite pest that causes damage to several buildings. Digestive enzymes have several biotechnological applications and may consist in targets for insect control. This work reports the detection of cellulases (endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase), hemicellulases ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylanase),  $\alpha$ -amylase, and proteases (trypsin-like, chymotrypsin-like, kallikrein-like and keratinase-type) in gut extracts from *N. corniger* workers and soldiers. Enzyme activities were evaluated after incubation of gut extracts at different temperatures and pH values and with termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva*. The adaptability of this termite species to digest lignocellulosic materials was evidenced by the high values of endoglucanase and  $\beta$ -xylanase activities. Zymography for proteases of worker extract revealed that polypeptides of 22, 30 and 43 kDa hydrolyzed caseina. Effect of protease inhibitors showed that serine proteases were the main proteases at worker and soldier gut. Trypsin-like and kallikrein-like activities were detected at highest levels. The results from heat and pH stability assays revealed the presence of distinct digestive apparatus between workers and soldiers. *M. urundeuva* lectins distinctly affected the enzyme activities and their termiticidal activity may be linked to modulation of digestive enzymes. This work is a first step on the study of *N. corniger* digestive enzymes and stimulates their purification and evaluation of biotechnological potential.

**Keywords:** *Nasutitermes corniger*; amylase; lignocellulolytic enzymes; serine proteases; *Myracrodruon urundeuva*; lectins.

## 1. Introduction

Termites (Order Isoptera) are eusocial insects that can be classified in the morpho-physiologically distinct castes queens, kings, alate forms (reproductives), workers, soldiers and immature individuals. They act as primary consumers or decomposers acting in nutrient recycling by grinding, decomposition, humification, and mineralization of cellulosic resources and their variants (Prins and Kreulen, 1991; Tayasu et al., 1997; Costa-Leonardo, 2002).

Termites are able to feed on wood using appropriate digestive mechanisms capable of metabolizing cell wall polymers into absorbable units. Several lignocellulosic materials can be degraded by termites due to the presence in their gut of cellulases and hemicellulases. Starch and glycogen can be hydrolyzed by amylases while protein and peptide components present in soil humic substances are hydrolyzed by proteases (Waller and La Fage, 1986; Ji and Brune, 2005). In higher termites (Termitidae family), these digestive enzymes are encoded by termite genome or produced by gut symbiotic bacteria, such as spirochetes and fibrobacters (Warnecke et al., 2007).

The knowledge of the enzymatic apparatus found in the gut of a termite species has biological and biotechnological importances. The high efficiency of lignocellulolytic natural systems found in termite gut makes them important models to be studied for use in the processing of lignocellulosic biomass for biofuel production (Sun and Scharf, 2010). Amino acid sequencing, cloning and expression of enzymes in heterologous systems allow their production in large scale by genetic engineering techniques (Olempska-Beer et al., 2006).

Apart from the biotechnological potential, the detection and further characterization of digestive enzymes from termites contributes to expand the panel of digestive processes in these insects and for directing the search, isolation and characterization of natural insecticides that can act interfering in enzymatic activities, such as enzyme inhibitors, lectins and secondary metabolites from plants. In addition, the modern computational biology techniques



may allow the modeling and synthesis of new compounds targeting insect enzymes with high specificity.

Lectins are carbohydrate-binding proteins able to agglutinate cells by recognition of glycoconjugates in cell surfaces (Correia et al., 2008). Plant lectins have been shown to interfere in feeding, development, and survival of insects (Paiva et al., 2011a, 2012). Several mechanisms of action have been suggested for insecticidal lectins, such as: interaction with cell membrane glycoconjugates along the digestive tract affecting signaling pathways and transport processes (Fitches et al., 2008); binding to chitin and *N*-acetylglucosamine residues of peritrophic membrane interfering with its integrity and affecting digestion and absorption of nutrients (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Macedo et al., 2007); and destabilizing of insect metabolism by interfering in enzymatic functions (Macedo et al., 2007; Napoleão et al., 2012; Paiva et al., 2012). Lectins have been reported as termiticidal agents (Sá et al., 2008; Silva et al. 2009; Napoleão et al., 2011; Paiva et al., 2011b; Souza et al., 2011; Araújo et al., 2012).

*Nasutitermes corniger* (Termitidae) is a soil-feeding and wood-damaging termite species. It is considered a threat to urban centers and has been favored by environmental imbalance (Figueiredo, 2004). However, the knowledge on digestive enzymes from this species is dramatically scarce. Chitin-binding lectins isolated from *Myracroduton urundeuva* bark (MuBL), heartwood (MuHL) and leaf (MuLL) showed termiticidal activity against *N. corniger* (Sá et al. 2008; Napoleão et al., 2011). In an initial effort aiming at investigate the mechanisms of termiticidal activity, it was demonstrated that *M. urundeuva* lectins exhibited bacteriostatic and bactericidal effects on gut symbionts of *N. corniger* workers and soldiers as well as the hemagglutinating activities of MuBL, MuHL and MuLL were not affected by incubation with gut extracts from *N. corniger* containing trypsin-like activity, indicating the resistance of these lectins to digestion at termite gut (Napoleão et al., 2011).

This paper describes the assessment of cellulolytic (endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase), hemicellulolytic ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-xylanase) amylolytic ( $\alpha$ -amylase) and proteolytic (total proteases, trypsin-like, chymotrypsin-like, keratinase-type and kallikrein-like enzymes) activities in gut extracts of *N. corniger* workers and soldiers. Also, the enzyme activities detected in *N. corniger* gut were evaluated for sensitiveness to *M. urundeuva* lectins, which is an additional step in the study on the termiticidal mechanism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insects

Termite colonies of *N. corniger*, selected according to overall integrity criteria, were collected from Atlantic Forest fragment located at the campus of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco*, Recife, Brazil. The nests were transferred to laboratory, and maintained at  $28 \pm 2$  °C at darkness.

### 2.2. Plant material

Bark, heartwood and leaves of *M. urundeuva* were collected in the State of Maranhão, northeastern Brazil and a voucher specimen is archived under number 054 at the *Herbarium Aluisio Bittencourt, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão*, Brazil. The tissues were air dried, powdered (40 mesh) and stored at 28 °C.

### 2.3. Termite gut extracts

Groups of 100 workers or soldiers of *N. corniger* were collected and immobilized by placing them at -20 °C for 10–15 min. Each termite was decapitated using a needle (8 mm in

length; 0.3 mm caliber) and its gut was removed intact by pulling on the last abdominal segments. The guts were stored on ice in 0.1 M sodium acetate pH 5.5 or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, both containing 0.15 M NaCl.

*N. corniger* gut extracts were obtained according to Napoleão et al. (2011). A group of guts from 100 workers or soldiers were placed in a 2 mL glass tissue grinder and manually homogenized with 1 mL of the buffer solution used in dissection. The homogenates were then centrifuged at 9,000 g at 4 °C during 15 min. The collected supernatants (worker or soldier gut extracts) were used for evaluation of enzyme activities. The extracts in sodium acetate buffer were used in assays for cellulase, hemicellulase and  $\alpha$ -amylase activities while extracts in Tris buffer were used in the assays for total protease activity as well as for evaluation of serine proteases (trypsin-like, chymotrypsin-like, kallikrein-like and keratinase-type).

#### 2.4. Protein content

Protein concentration was evaluated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich, USA) as standard.

#### 2.5. Cellulases

##### 2.5.1. Endoglucanase and exoglucanase activities

Assays for endoglucanase and exoglucanase were carried out according to adaptations of the methods described by Li et al. (2009) and Wood and Bhat (1988), respectively. The reactions started by incubating (50 °C, 10 min) worker (330  $\mu$ g of protein) or soldier (270  $\mu$ g of protein) gut extracts with 400  $\mu$ L of a 1% (w/v) carboxymethylcellulose (for endoglucanase activity; Sigma-Aldrich, USA) or 1% (w/v) Avicel (for exoglucanase activity; Sigma-Aldrich, USA) solution in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. After

incubation, 500  $\mu$ L of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) were added to stop the reaction and the mixtures were heated (100 °C, 6 min) and immediately cooled in ice (15 min). Then, the absorbance at 540 nm was measured. The amount of reducing sugars was determined using glucose as standard ( $Y=0.1261X-0.0157$ ;  $Y$  is the absorbance at 540 nm;  $X$  is the glucose concentration in mg/mL). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1  $\mu$ mol of glucose per minute. Blanks were performed submitting worker and soldiers gut extracts to the same reaction steps in absence of substrate.

#### 2.5.2. $\beta$ -Glucosidase activity

An adaptation of the method described by Tan et al. (1987) was used to assess  $\beta$ -glucosidase activity. Worker (330  $\mu$ g of protein) or soldier (270  $\mu$ g of protein) gut extract was incubated (50 °C; 10 min) with 400  $\mu$ L of 0.1 % (w/v)  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG; Sigma-Aldrich, USA) solution in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. After incubation, 500  $\mu$ L of 10% (w/v) sodium bicarbonate were added to stop the reaction and the absorbance at 410 nm was measured. The amount of  $p$ -nitrophenol (pNP) released by hydrolysis of pNPG was determined using pNP as standard ( $Y=32.224X+0.0783$ ;  $Y$  is the absorbance at 410 nm;  $X$  is the pNP concentration in mg/mL). One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1  $\mu$ mol of pNP per minute. Reaction blanks were performed without pNPG.

### 2.6. Hemicellulases

#### 2.6.1. $\beta$ -Xilosidase and $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities

The activities of  $\beta$ -xilosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase were determined according an adaptation of Tan et al. (1987) method. The worker (330  $\mu$ g of protein) or soldier (270  $\mu$ g

of protein) gut extract was incubated (50 °C; 10 min) with 400 µL of 0.1% (w/v) *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (*p*NPX; Sigma-Aldrich, USA) or *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (*p*NPArif; Sigma-Aldrich, USA) solutions in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. The reaction was stopped with 500 µL of 10% (w/v) sodium bicarbonate and the absorbance at 410 nm was measured. The amount of *p*NP released was determined using *p*NP as standard ( $Y=32.224X+0.0783$ ;  $Y$  is the absorbance at 410 nm;  $X$  is the *p*NP concentration in mg/mL). One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of *p*NP per minute. Reaction blanks were performed in absence of substrates.

#### 2.6.2. $\beta$ -D-Xylanase activity

Assay for  $\beta$ -D-xylanase was carried out according an adaptation of Wood & Bhat (1988) method. Initially, worker (330 µg of protein) or soldier (270 µg of protein) gut extracts were incubated (50 °C, 10 min) with 400 µL of a 1% (w/v) xylan (Sigma-Aldrich, USA) solution in sodium acetate pH 5.5 containing 0.15 M NaCl. Next, 500 µL of DNS were added to stop the reaction and the mixtures were heated (100 °C, 6 min) and immediately cooled in ice (15 min). The absorbance at 540 nm was measured and the amount of reducing sugars was determined using xylose as standard ( $Y=0.1183X-0.0704$ ;  $Y$  is the absorbance at 540 nm;  $X$  is the glucose concentration in mg/mL). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to generate 1 µmol of xylose per minute. Reaction blanks were performed without xylan.

#### 2.7. $\alpha$ -Amylase

The assay was carried out based on the method described by Bernfeld (1955). Worker (330 µg of protein) or soldier (270 µg of protein) was incubated at 50 °C for 10 min with 400

μl of a 1% (w/v) soluble starch (Merck, Germany) in 0.1 M sodium acetate pH 5.5 containing 0.02 M CaCl<sub>2</sub> and 0.15 M NaCl. The reaction was stopped by adding 500 μl of DNS. Next, the assays were heated at 100 °C in boiling water for 6 min and immediately cooled on ice for 15 min. Then, absorbance was measured at 540 nm. The amount of reducing sugars was determined using a standard curve of the reaction of different glucose concentrations with DNS ( $Y=0.1183X-0.0704$ , where  $Y$  is the absorbance at 540 nm and  $X$  is the glucose concentration in mg/ml). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 μmol of glucose per minute. Reaction blanks were performed without starch.

## 2.8. *Proteases*

### 2.8.1. *Total protease activity*

Protease activity was determined using azocasein (Sigma-Aldrich, USA) as substrate according to Azeez et al. (2007). Worker (360 μg of protein) or soldier (245 μg of protein) gut extracts were mixed with 300 μL of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 containing 50 μL of 0.6% (w/v) azocasein. The mixtures were supplemented with 100 μL of 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated at 37 °C for 3 h. The reaction was stopped by adding 200 μL of 10% (v/v) trichloroacetic acid. Following, the mixtures were incubated at 4 °C for 30 min, centrifuged at 9,000 g for 10 min and the absorbance of the supernatant at 366 nm was determined. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that gave an increase of 0.01 in absorbance.

### 2.8.2. *Polyacrylamide gel electrophoresis and zymography for proteases*

Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 12 % (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptides from gut extracts and molecular mass markers ( $\beta$ -galactosidase, 120,000 Da, bovine serum, 91,000 Da, glutamate dehydrogenase, 62,000 Da, ovalbulmin, 46,000 Da, carbonic anhydrase, 38,000 Da, myoglobin, 26,000 Da, lysozyme, 19,000 Da, aprotinin, 9,000 Da from Amresco, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid (0.02%, v/v).

Zymography for proteases was carried out according the method described by Garcia-Carreño et al. (1993). Sample of worker or soldier gut extract (25  $\mu$ g of protein) in Tris buffer was prepared and submitted to SDS-PAGE using a 12 % (w/v) gel. After electrophoresis at 4 °C, the gel was immersed in 2.5% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 to remove SDS and incubated with 3% casein (w/v) in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 for 30 min at 4 °C. The temperature was raised to 37 °C and kept for 90 min to allow the digestion of casein by the active fractions. Finally, the gel was stained for protein using 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid and the gel was washed with destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid, and 50% distilled water). Light bands against the dark background indicated proteolytic activity.

### 2.8.3. Effect of inhibitors on protease activity

The effect of inhibitors on *N. corniger* protease activity was investigated. Pepstatin A (8 mM), trans-Epoxy succinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butane (E-64; 8 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 8 mM) and ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA, 8 mM), all purchased from Sigma-Aldrich (USA), were added (1:1 ratio) to *N. corniger* gut extracts and the mixtures were incubated at 37 °C for 30 min. Next, protease activity assay was performed according section 2.8.1. Residual protease activity was determined in comparison with control without inhibitors (100% of activity).

#### 2.8.4. Serine protease activities

Trypsin-like, chymotrypsin-like, keratinase-type and kallikrein-like enzymes were evaluated using the synthetic substrates N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (8 mM), N-succinyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (11 mM), N-succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitroanilide (11 mM) and H-D-prolyl-phenylalanyl-arginine-p-nitroanilide (5 mM), respectively. Worker or soldier gut extracts (50 µg of protein) was incubated for 1 h at 37 °C with Tris buffer (35 µL) and each substrate (15 µL). The enzyme reaction was stopped with 30% (v/v) acetic acid (50 µL). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 µmol of substrate per minute.

#### 2.9. Effect of temperature and pH on enzyme activities

Enzyme activities from *N. corniger* gut extracts were evaluated after heating for 30 min at 30–100 °C. The effect of pH on activities was evaluated by incubation (24 h; 4 °C) of *N. corniger* gut extracts in different solutions (0.1 M citrate phosphate buffer, pH 3.0 to 6.0; 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0; 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 and 9.0; NaOH solution pH 10.0 and 11.0) before determination of enzyme activities.

#### 2.10. Purification of MuBL, MuHL and MuLL

MuBL and MuHL were isolated according to Sá et al. (2009) and MuLL was obtained following the protocol described by Napoleão et al. (2011). Powdered bark, heartwood or leaves (10 g) were suspended in 0.15 M NaCl (100 mL). Clear supernatants (crude extracts) were obtained after homogenization in a magnetic stirrer (16 h at 4°C) followed by filtration through gauze and centrifugation (3,000 g, 15 min). Soluble proteins in crude extract were fractionated with ammonium sulphate according to Green and Hughes (1955). The 40%



supernatant fraction from bark extract, the 40-60% precipitate from heartwood extract, and the 60-80% from leaf extract were collected. The fractions were dialyzed (3,500 Da cut-off membrane, 4 °C) against distilled water (4 h) followed by 0.15 M NaCl (4 h) and separately loaded onto chitin (Sigma-Aldrich, USA) columns (7.5 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl (100 mL) at flow rate of 20 mL h<sup>-1</sup>. The unabsorbed proteins were eluted with equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was negligible. Then the adsorbed hemagglutinating activity (MuBL, MuHL or MuLL) was eluted with 1.0 M acetic acid and exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl (1 L) for eluent elimination.

### *2.11. Hemagglutinating activity*

Hemagglutinating assay was carried out in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using suspension (2.5% v/v) of human (A, B, AB and O types) or rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). One hemagglutinating unit (titer) was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample promoting full erythrocyte agglutination (Napoleão et al., 2011). Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg mL<sup>-1</sup>).

### *2.12. Effect of MuBL, MuHL and MuLL on enzyme activities*

The effects of MuBL, MuHL and MuLL on cellulase, hemicellulase and  $\alpha$ -amylase activities were evaluated by incubating (30 min at 27 °C) worker (330  $\mu$ g of protein) or soldier (270  $\mu$ g of protein) gut extract in acetate buffer with the lectin (in proportion of 1  $\mu$ g for 10  $\mu$ g of protein in gut extract) before determination of activity. Control assays were performed by submitting MuBL, MuHL and MuLL in acetate buffer to the same reaction steps.

The effect of lectins on protease activity was evaluated by incubating (30 min at 37 °C) worker (360 µg of protein) or soldier (245 µg of protein) gut extract in Tris buffer with lectin (in proportion of 1 µg:10 µg of protein in gut extract) before determination of protease activity as described above. The activity of trypsin-like and from worker or soldier gut extracts (50 µg of protein) in Tris buffer was also determined after incubation (30 min, 37 °C) with MuBL, MuHL or MuLL (in proportion of 1 µg:10 µg of protein in gut extract). Control assays were performed by submitting preparation of lectin to the same reaction steps.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Cellulase and hemicellulase activities

Protein contents determined in extracts from *N. corniger* workers and soldiers in acetate and Tris buffers were 7.4 and 9.1 mg/mL, respectively. Table 1 shows the results from detection of cellulase activities. Endoglucanases were the most active cellulolytic enzymes at gut extracts from *N. corniger* workers and soldiers, followed by exoglucanases. The levels of β-glucosidase were very low in comparison with the other cellulases. Gut extract of *N. corniger* workers showed an endoglucanase activity more than two times higher than that detected in soldier gut extract. Similarly, the endoglucanase activity at the midgut of *Nasutitermes takasagoensis* was high in workers and low in soldiers (Fujita et al., 2008). Nevertheless, exoglucanase and β-glucosidase activities from *N. corniger* were highest in soldier gut extract (Table 1).

The results described above may reflect the different eating habits between the castes. According to Grassé (1949) immature, alate forms and soldiers are unable to feed themselves and receive from workers estomodeal or proctodeal food like regurgitated food, saliva or liquid excreta rich in symbionts. Once the soldiers are nourished by partially or completely

digested food, the presence of an endoglucanase level similar to that found in workers would not be required in soldier's gut. Otherwise, the enzymes exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase, which are responsible for the final digestion of cellulose components, would be present in soldiers at higher concentrations than workers aiming to optimize the absorption since the soldiers do not feed actively.

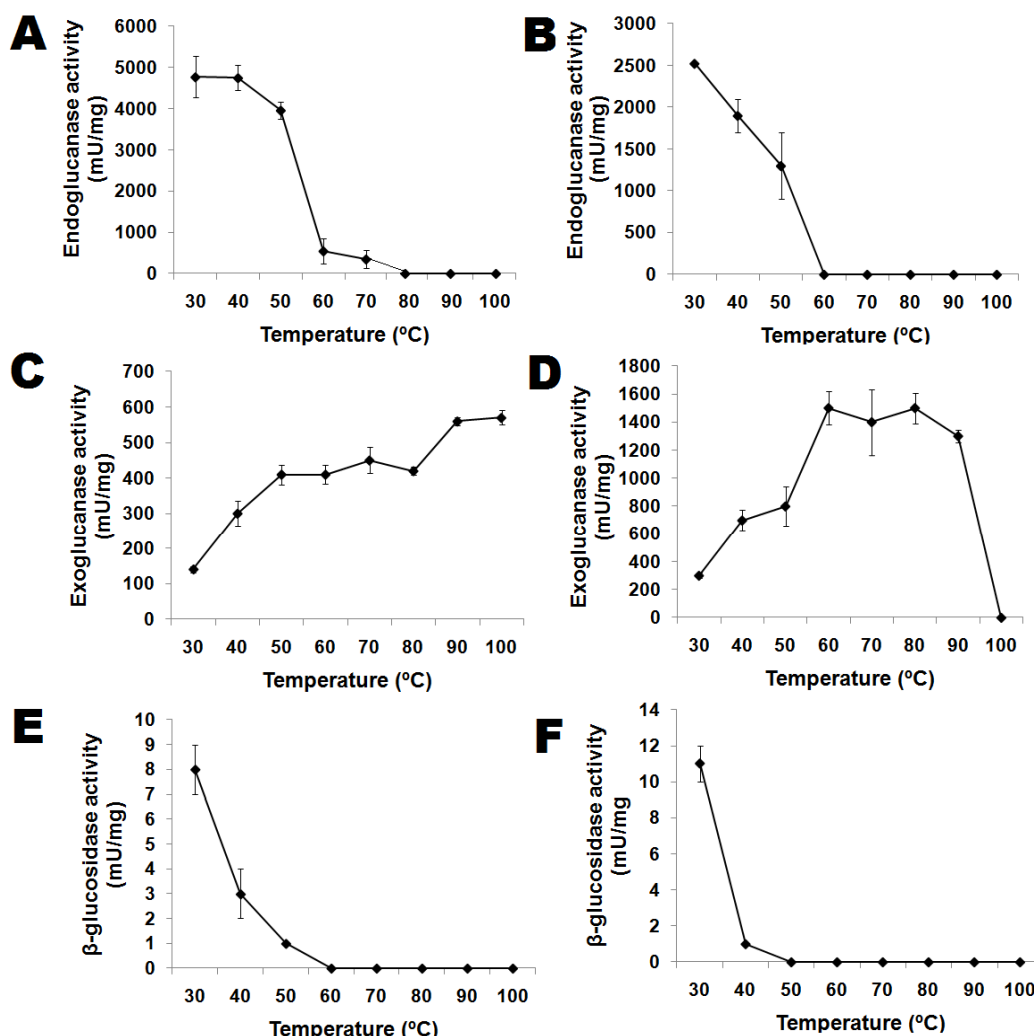
**Table 1.** Enzyme activities from gut extracts of *N. corniger* workers and soldiers.

Enzyme	Workers	Soldiers
	Specific activity <sup>a</sup>	Specific activity <sup>a</sup>
<i>Cellulases</i> (mU/mg)		
Endoglucanase	4600 $\pm$ 300	2100 $\pm$ 500 *
Exoglucanase	140 $\pm$ 10	300 $\pm$ 25 *
$\beta$ -glucosidase	10 $\pm$ 0.0	80 $\pm$ 1 *
<i>Hemicellulases</i> (mU/mg)		
$\beta$ -xylosidase	5.8 $\pm$ 1.0	6.1 $\pm$ 0.8
$\alpha$ -L-arabinofuranosidade	0.72 $\pm$ 0.3	0.63 $\pm$ 0.1
$\beta$ -D-xylanase	960 $\pm$ 170	130 $\pm$ 20 **
$\alpha$ -Amylase (U/mg)	24.7 $\pm$ 2.5	5.2 $\pm$ 1.5 **
<i>Proteases</i>		
Total protease (U/mg)	215 $\pm$ 12.2	18.3 $\pm$ 5.3 **
Trypsin-like (mU/mg)	6.0 $\pm$ 0.41	2.4 $\pm$ 0.06 *
Chymotrypsin-like (mU/mg)	0.53 $\pm$ 0.2	0.13 $\pm$ 0.09 *
Kallikrein-like (mU/mg)	17 $\pm$ 0.3	1.56 $\pm$ 0.05 **
Keratinase-type (mU/mg)	0.40 $\pm$ 0.08	0.15 $\pm$ 0.1 *

<sup>a</sup> Specific enzyme activities were calculated by the ratio between the number of enzyme units and the total amount (mg) of protein used in the assays. All data are presented as mean  $\pm$  SD of three replicates. Statistical analysis using Student *t*-test indicates that enzyme activity from soldier gut extract was significantly different from that of worker gut extract at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*).

The effect of heating on the activity of cellulases is shown in Figure 1. Endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase activities from worker and soldier gut extracts were sensitive to high temperatures. Heating at 60 °C reduced the worker endoglucanase activity in 88.0 % (Figure 1A) while  $\beta$ -glucosidase activity was reduced in 82% after heating at 50 °C (Figure 1E); these

enzyme activities were neutralized at 80 °C and 60°C, respectively. Soldier endoglucanase activity declined 46 % after treatment at 50 °C (Figure 1B) and  $\beta$ -glucosidase activity was reduced in 90% after treatment at 40 °C (Figure 1F); endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from soldier extract were neutralized at 60 and 50 °C, respectively. On the other hand, exoglucanase activities from worker and soldier gut extracts enhanced after heating. The activity from workers increased six times after heating at 100 °C (Figure 1C) and the activity from soldiers increased about five times after heating at 90 °C, although it was neutralized after heating at 100 °C (Figure 1D).



**Figure 1.** Effect of heating on endoglucanase (A and B), exoglucanase (C and D) and  $\beta$ -glucosidase (E and F) activities from *N. corniger* worker (A, C and E) and soldier (B, D and F) gut extracts.

The evaluation of the effect of temperature on cellulase activities from other insects has demonstrated similar results. The endoglucanase activity from *Tribolium castaneum* (Coleoptera) was reduced at temperatures higher than 50 °C and an endoglucanase from *Coptotermes formosanus* (Isoptera) heterologously expressed in *Escherichia coli* were active between 20 and 70 °C (Inoue et al., 2005; Rehman et al., 2009). The  $\beta$ -glucosidases from *Neotermes koshunensis* (Isoptera) showed stability from 20 °C up to 45 °C and cellulases from actinomycetes isolated from termite species *Macrotermes*, *Armitermes*, *Odontotermes* and *Microcerotermes* were stable until 48 °C (Pasti and Belli, 1985; Tokuda et al., 2002).

Cellulase activities were also determined after incubation of the extracts at different pH values. These enzymes from workers and soldiers were active after incubation at a wide range of acidic (3.0–6.0) and basic (9.0–11.0) pH. The highest endoglucanase (8100 mU/mg), exoglucanase (470 mU/mg) and  $\beta$ -glucosidase (14 mU/mg) activities from worker gut extract were detected at pH 4.0, 3.0 and 11.0, respectively. For soldiers, the maximum endoglucanase (5400 mU/mg), exoglucanase (620 mU/mg) and  $\beta$ -glucosidase (14 mU/mg) activities were found after incubation of gut extract at pH 4.0, 7.0, and 4.0, respectively.

The detection of activity at different pH values has been reported for termite cellulases and the pH in which they have maximum activity is variable between different species. Similar to endoglucanase activity of *N. corniger*, cellulases from *Macrotermes mülleri* showed highest activity at pH 4.4 (Rouland et al., 1989); otherwise, a *Coptotermes formosanus* endoglucanase showed maximum activity at pH 5.8 to 6.0 (Inoue et al., 2005). The optimum pH for  $\beta$ -glucosidases from *Nasutitermes exitiosus* ranged from 2.0 to 2.8 in foregut, 2.8 to 3.8 in rectum, and 6.8 to 7.5 in midgut and mixed segment (McEwen et al., 1980).

The pH affects the shape, charge properties, the correct positioning of the substrate and the ionization of side chains of amino acids in both the active site as in whole enzyme

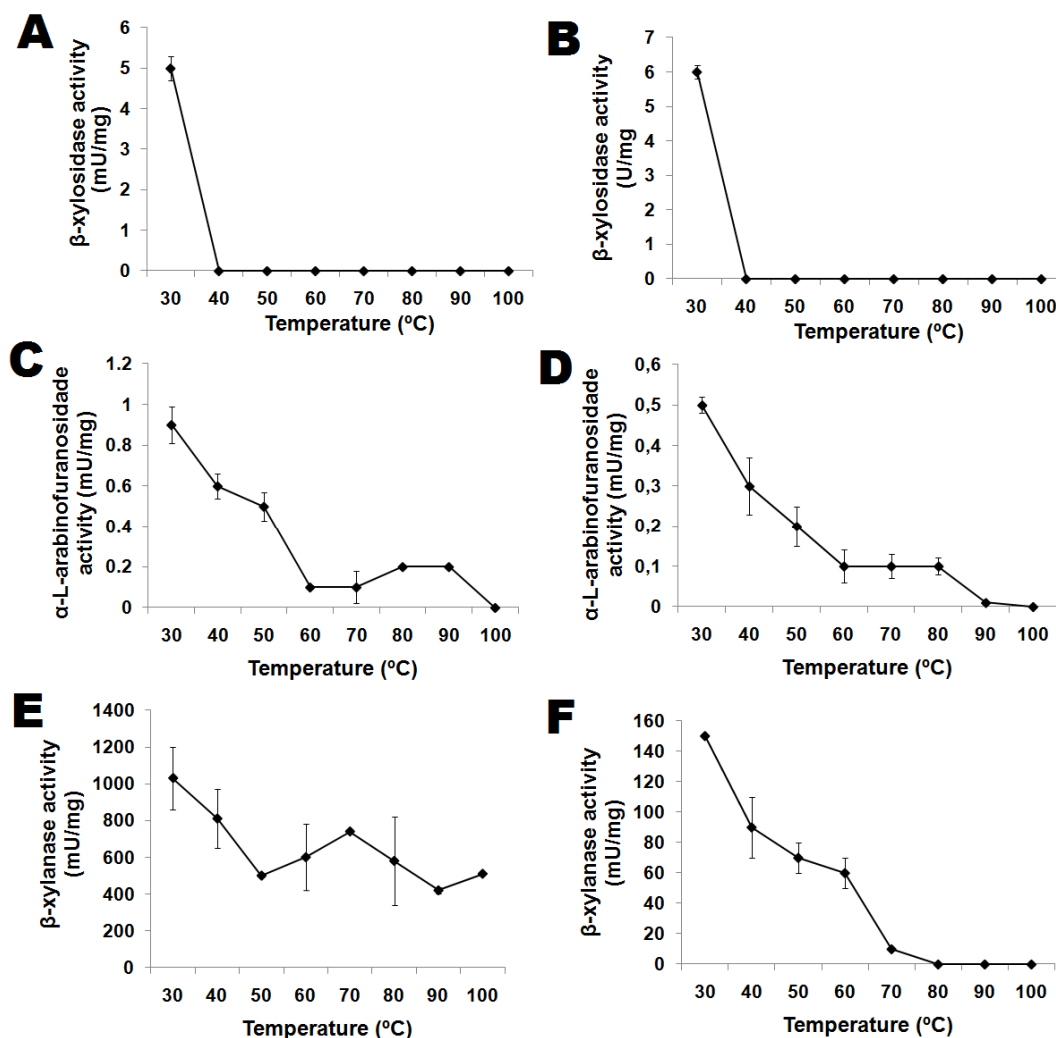
(Purich, 2010). Endogenous endoglucanase with highest activity at pH 5.6 was isolated from the higher termite *Nasutitermes takasagoensis* and the enzyme structure was studied by crystallography revealing a common folding pattern for glycosyl hydrolases; the study showed that the overall structure of the endoglucanase at pH 6.5 is similar to that at pH 5.6 but the authors observed a conformation change at catalytic site in side chain displacement of Glu412 residue, which may decrease the enzyme activity at pH higher than 5.6 (Khademi et al. 2002).

The three hemicellulases evaluated were detected in gut extracts of *N. corniger* workers and soldiers (Table 1). The  $\beta$ -D-xylanase was the most active hemicellulase and the level of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase was very low. The xylans are among the main components of lignocellulosic structures and the high level of  $\beta$ -D-xylanase indicated the high adaptability of *N. corniger* to feed on these materials. The  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase act specifically hydrolyzing non-reducing terminals containing L-arabinosil residues, which are present only in some moieties of the polysaccharide molecules; thus, it is expected that their levels are lower pronounced than other hemicellulases at termite gut.

The  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities showed similar levels in workers and soldiers but  $\beta$ -D-xylanase activity was higher in workers than soldiers. Two  $\beta$ -D-xylanases from *Macrotermes mülleri* workers were isolated; the first was isolated from crude extract of insects and the other was isolated from crude extract of symbiotic microorganism *Termitomyces* sp. (Rouland et al., 1988).

The effect of heating on the activity of hemicellulases is shown in Figure 2. The  $\beta$ -xylosidase activities from workers and soldiers were sensitive to heating and the enzymes were inactivated at 40 °C (Figures 2A and 2B). The  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-xylanase activities also decreased with the heating, but the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity from workers and soldiers was neutralized only at 100 °C (Figure 2C) and  $\beta$ -xylanase activity

from workers was not abolished even after heating at 100 °C (Figure 2E). The  $\beta$ -xylosidase activity from soldiers was neutralized after heating at 80 °C (Figure 2F).



**Figure 2.** Effect of heating on  $\beta$ -xylosidase (A and B),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (C and D) and  $\beta$ -D-xylosanase (E and F) activities from *N. corniger* worker (A, C and E) and soldier (B, D and F) gut extracts.

Hemicellulase activities were also determined after incubation of the extracts at different pH values. Hemicellulases from workers and soldiers were active after incubation at a wide range of acidic (3.0-6.0) and basic (9.0-11.0) pH, with exception  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from soldiers, which activity was not detected at pH 4.0, 5.0, 10.0 and 11.0. The highest  $\beta$ -xylosidase (8.0 mU/mg),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (0.7 mU/mg) and  $\beta$ -D-

xylanase (2700 mU/mg) activities from worker gut extract were detected after incubation at pH 11.0, 6.0 and 7.0, respectively. For soldier gut extract, highest  $\beta$ -xylosidase (7.0 mU/mg),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (0.4 mU/mg) and  $\beta$ -D-xylanase (1240 mU/mg) activities were determined at pH 10.0/11.0, 7.0, and 8.0, respectively.

The detection of high levels of cellulase and hemicellulase activities in *N. corniger* gut and the relative heat-stability of endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -xylanase activities are valuable stimuli for the study of digestive apparatus of this termite aiming its application in the bioconversion of lignocellulosic biomass. Cellulases may be also used in production of pharmaceuticals and detergents, wastewater treatment and processing of fruits and vegetables (Mamma et al., 2009).

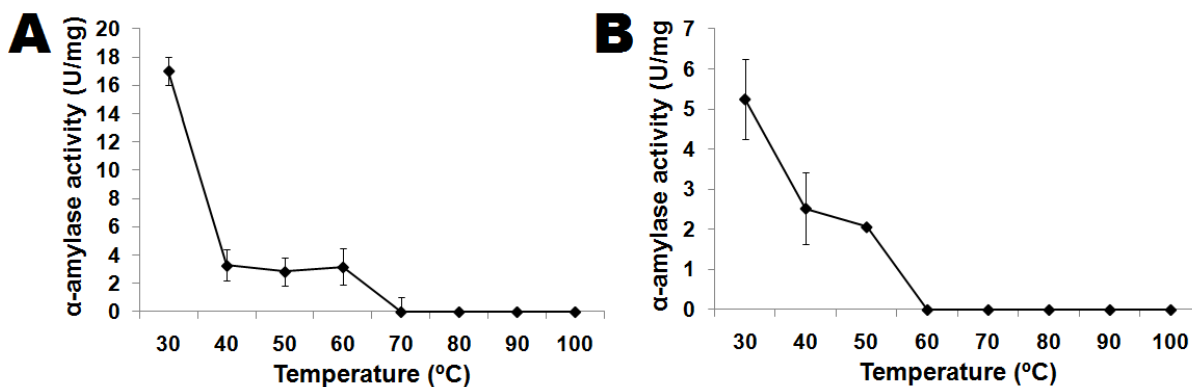
### 3.3. $\alpha$ -Amylase activity

Gut extracts of *N. corniger* workers and soldiers were able to promote starch hydrolysis (Table 1). The  $\alpha$ -amylase activity from workers was higher than that detected for soldier gut extract. The presence of  $\alpha$ -amylase has been reported in the digestive systems of insects of the orders Orthoptera, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera and Coleoptera (Terra and Ferreira, 1994) and these enzymes are important for optimal larval growth and adult longevity. Amylases from termites have been poorly studied. Hogan et al. (1988) reported the presence of low levels of amylase activity in *Nasutitermes walkeri* in salivary glands (18%) and midgut (73%) with traces found in the other gut sections. However, in *Mastotermes darwiniensis* (lower termite) amylase activity was detected mainly in salivary glands, constituting 81% of the total amylase activity (Veivers et al., 1982).

The  $\alpha$ -amylase activity from worker and soldier gut extracts was sensitive to heating (Figure 3). The activity was reduced in 80.8% after heating at 40 °C for workers and diminished 61.5% after heating at 50 °C for soldiers. The activities of worker and soldier



amylases were neutralized after heating at 70 and 60 °C, respectively. The amylolytic activity from gut of coleopterans *Prostephanus truncatus*, *Morimus funereus* and *Rhyzopertha dominica* were abolished at 60, 70 and 80 °C, respectively (Mendiola-Olaya et al., 2000; Dojnov et al., 2008; Priya et al., 2010).



**Figure 3.** Effect of heating on  $\alpha$ -amylase activity from *N. corniger* worker (A) and soldier (B) gut extracts.

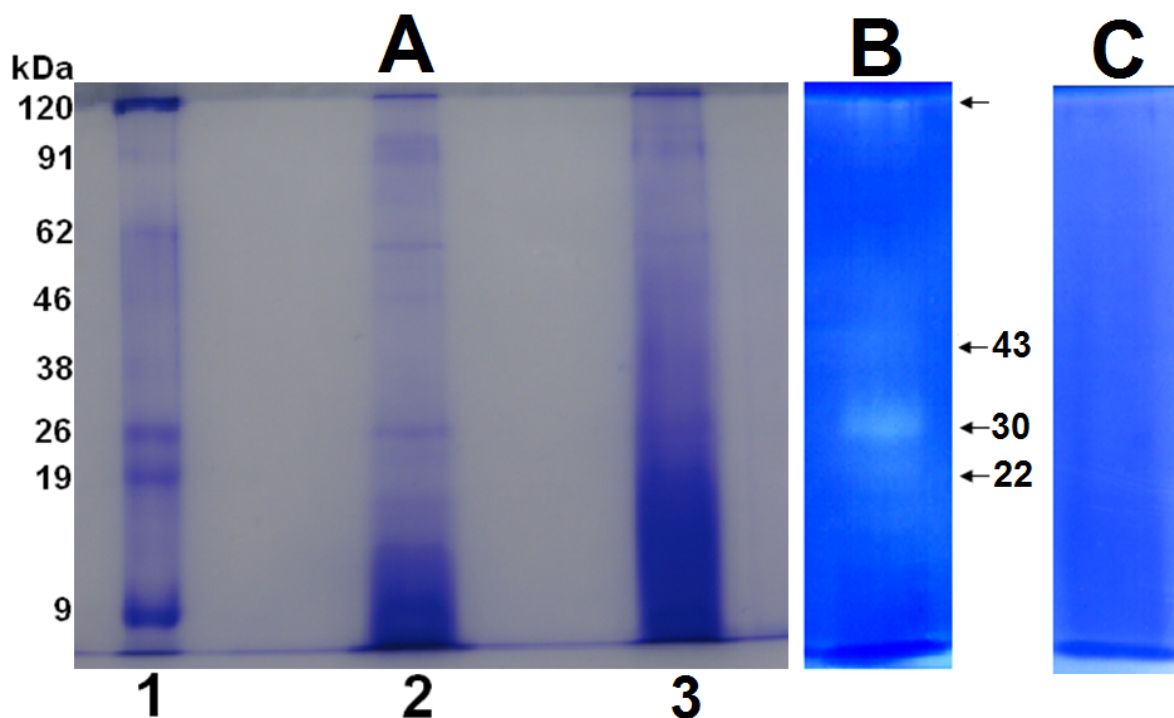
Worker and soldier gut amylases were active after incubation at a wide pH range (3.0–11.0) and the activities were highest at pH 6.0 (24.9 and 5.4 U/mg, respectively). The pH at which other insect amylases showed best activity is also variable. Highest activities of coleopteran and lepidopterans  $\alpha$ -amylases have been described at pH 5.2 (*Morimus funereus*), 6.0 (*Prostephanus truncatus*), 7.0 (*Rhyzopertha dominica*) and 9.0 (*Chilo suppressalis* and *Glyphodes pyloalis*) (Mendiola-Olaya et al., 2000; Dojnov et al., 2008; Zibae et al., 2008; Priya et al., 2010; Yezdani et al., 2010).

Insect  $\alpha$ -amylases have been described as targets of enzyme inhibitors involved in defense from plants (Mendiola-Olaya et al., 2000). The  $\alpha$ -amylase inhibitors are highly specific for their target enzymes and their use for insect control is dependent on the clear understanding of the expression of different  $\alpha$ -amylase isoforms in the insect digestive tract (Franco et al., 2002).

### 3.4. Protease activity

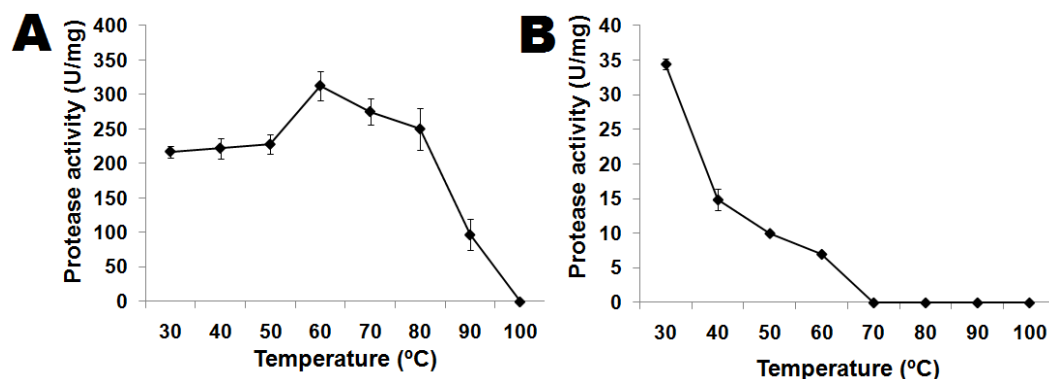
Protein contents determined in extracts from *N. corniger* workers and soldiers in Tris buffer were 11.2 and 5.3 mg/mL, respectively. Protease activity was detected in worker gut extract but was very lower in soldier gut extract (Table 1). Ji and Brune (2000) showed that the combined action of extreme alkalinity in the hindgut, autooxidative process and proteolytic activity make soil-feeding termites able to use peptidic components of humic acids as source of carbon and energy. Soil is composed of a large proportion of hydrolysable peptides (Kelley and Stevenson, 1996) and up to 20% of the total organic carbon adsorbed on soil particles may be from peptidic carbon (Knicker et al., 2000). Protease activity was detected predominantly in the midgut of termites *Odontotermes formosanus*, *Pericaproitermes nitobei*, *Termes comis*, *N. takasagoensis* and *Macrotermes annandalei* (Fujita and Abe, 2002).

SDS-PAGE of worker gut extract in Tris buffer showed the presence of multiple polypeptide bands (Figure 4A, lane 2). Zymography of worker gut extract revealed proteolytic activity for the polypeptide bands of 22, 30 and 43 kDa and for a polypeptide of high molecular mass ( $\geq 120$  kDa) observed on the top of the gel (Figure 4B). The molecular masses of the *N. corniger* worker proteases detected on gel are similar to that found for other insect proteases. Polypeptide bands of 23-24 kDa were visualized on casein zymographies of midgut preparations from *R. dominica* and spectrometry mass analysis revealed trypsins from *Spodoptera littoralis* of 24.3 and 24.4 kDa (Marchetti et al., 1998; Zhu and Baker, 1999). SDS-PAGE revealed molecular masses of trypsins from *Manduca sexta* (Lepidoptera) larvae of 24 kDa, *Aedes aegypti* (Diptera) adults ranging from 28.5 and 32.0 kDa and *Locusta migratoria* (Orthoptera) adults of 23, 27 and 29 kDa (Miller et al., 1974; Graf and Briegel, 1985; Lam et al., 2000). Proteolytic activity from soldier gut extract was not detected by zymography (Figure 4C), probably due to low concentration of enzymes in the extract.



**Figure 4.** Characterization of *N. corniger* gut extract in Tris buffer by electrophoresis in polyacrylamide gel. (A) SDS-PAGE of molecular mass markers (lane 1) as well as worker (lane 2) and soldier (lane 3) gut extracts. Zymography for proteases of worker (B) and soldier (C) gut extracts on SDS-PAGE containing casein. Arrows indicated polypeptide bands with proteolytic activity.

*N. corniger* worker proteases showed a remarkable thermal stability and azocasein hydrolysis was still detected for extract heated until 90 °C; highest activity (312 U/mg) was detected after heating at 60 °C and the activity was neutralized only by heating at 100 °C (Figure 5A). Increase in enzyme activity can be promoted by molecular rearrangement of protein or may lead to a higher number of collisions and binding of enzyme to the substrate (Campbell and Reece, 2008). Proteases in soldier gut extract were more sensitive to heating than those in worker gut extract; soldier protease activity was neutralized after heating at 70 °C (Figure 5B).



**Figure 5.** Effect of temperature on protease activities from *N. corniger* worker (A) and soldier (B) gut extracts.

Worker and soldier proteases were active after incubation at a wide pH range (3.0–11.0); highest activities were detected after incubation at pH 4.0 and 8.0 for gut extracts from worker (248 U/mg) and soldier (40.0 U/mg), respectively.

Protease activity from *N. corniger* gut extracts were evaluated in presence of protease inhibitors (Table 2). The protease activity from worker gut was reduced after incubation with pepstatin A (inhibitor of aspartyl proteases), EDTA (inhibitor of metalloproteases), E-64 (inhibitor of cysteine proteases) and mainly PMSF (inhibitor of serine proteases). Soldier protease activity was only affected by PMSF and inhibition of 83% was detected. In according to these results, worker gut contains serine, aspartyl, metallo and cysteine proteases while the protease activity of soldier gut extract was due to presence of serine proteases. Since serine proteases were the major class of proteases detected in extracts of both castes, we evaluated the presence of enzymes capable of cleaving substrates specific for different serine proteases (trypsin-like, chymotrypsin-like, kallikrein-like and keratinase-type).

Trypsin-like activity was present in worker and soldier gut extracts but the worker extract was the most active preparation; chymotrypsin level was low in both castes (Table 1). Napoleão et al. (2011) similarly detected trypsin-like activity from worker gut higher than soldier gut. However, to our knowledge, there are no reports involving the isolation and characterization of termite trypsins.

**Table 2.** Effect of inhibitors on protease activity from worker and soldier gut extracts.

Inhibitor	Residual protease activity (%)	
	Worker	Soldier
Pepstatin A	85.0 $\pm$ 2.4	100
EDTA	77.2 $\pm$ 3.6	100
E-64	86.1 $\pm$ 1.8	100
PMSF	55.2 $\pm$ 4.1	17.4 $\pm$ 2.6

The kallikreins are a group of serine proteases which possess an active site similar to that of trypsins but have been mainly implicated in coagulation and vasodilatation processes in mammals (Mares-Guias and Diniz, 1967). A search performed by us using the sequence of human plasma kallikrein on NCBI database revealed similarity regions between these enzymes and trypsin-like enzymes from the hymenopteran *Bombus terrestris* (NCBI reference sequence: XP\_003400108.1), the siphonapteran *Ctenocephalides felis* (Dreher-Lesnick et al., 2010), and the dipteran *Drosophila simulans* (Clark et al., 2007). Although kallikreins have not been reported in digestive systems of insects and other animals, the detection of these similarities, the high level of trypsin-like activity and the predominant presence of serine proteases at *N. corniger* gut stimulated us to evaluate the presence of kallikrein-like enzymes in worker and soldier gut extracts. Interestingly, gut extract from workers showed high levels of kallikrein-like activity even higher than those of trypsin, evidencing that the workers serine proteases have high affinity for the kallikrein substrate H-D-prolyl-phenylalanyl-arginine-p-nitroanilide. In soldiers gut extract, kallikrein activity was lower than that of trypsin. The specific role of kallikrein-like enzymes on *N. corniger* represents a new and interesting aspect to be studied in the future.

Some soils are rich in keratin or keratinized materials mainly from decomposing of materials from animal origin. Certain microorganisms and insects synthesize serine proteases called keratinases to digest the keratin present in feeding diet (Lin et al., 1982). However, the level of keratinase-type enzymes at *N. corniger* worker and soldier gut extracts was irrelevant

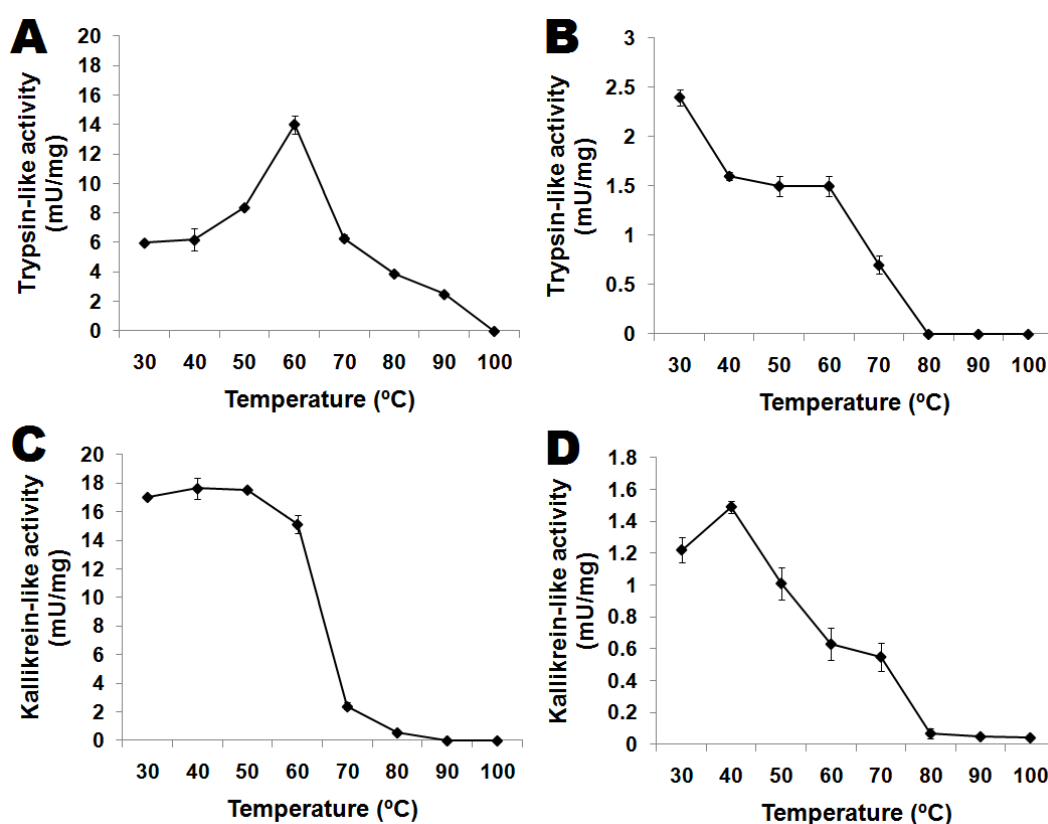
(Table 1). This result may be ascribed to the absence of high keratinase level on the soil at the forest from the termite colony was collected.

The effects of temperature and pH were evaluated on the main serine protease activities detected (trypsin-like and kallikrein-like). Worker gut extract showed increasing in trypsin-like activity after heating at 40 until 70 °C, with highest activity after heating at 60 °C; the enzyme activity was neutralized by heating at 100 °C (Figure 6A). Soldier trypsin-like activity was neutralized after heating at 50 °C (Figure 6B). A trypsin-like enzyme from *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera) also showed an increase in activity at 53 °C (Bernardi et al., 1996). *N. corniger* worker trypsin was more stable than trypsins described for other insects. Two trypsins found in *Spodoptera littoralis* lose their activities at 50-55°C (Marchetti et al., 1998) and the activity of *O. nubilalis* larval trypsin was reduced more than 70 % at 60 °C (Bernardi et al., 1996). Kallikrein-like activities from *N. corniger* workers and soldiers were also heat-stable, being almost neutralized only after heating at 70 and 80 °C, respectively (Figure 6C and 6D).

Trypsin-like and kallikrein-like activities were also detected after incubation at pH from 3.0 to 11.0 and highest activities were at pH 8.0 and 9.0 (workers) and 9.0 and 8.0 (soldiers) for trypsin and kallikrein-like, respectively. The results revealed the high stability of serine proteases from *N. corniger* worker and soldier to different pH values. The *R. dominica* (Coleoptera) trypsin was also active at pH range from 7.0 to 9.5 but trypsin-like from *Vespa orientalis* and *Vespa cabro* (Hymenoptera) were inactive at pH 8.0 and unstable below pH 5.0 (Jany et al., 1978; Zhu and Baker, 1999). Trypsins from *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera) and *Lygus lineolaris* (Heteroptera) showed highest activities at pH 10–12 (Zeng et al., 2002; Wang et al., 2003).

Although trypsin-like and kallikrein-like activities showed similar responses to changes in pH value, they were not affected by heating in a very similar manner. These results

may indicate that *N. corniger* gut contains two different sets of serine proteases. The stability of termite proteases stimulates their isolation and evaluation of potential biotechnological applications. Proteases may be applied in leather processing, production of biodegradable plastics, milk-clotting process, meat maturation and enzymatic synthesis of sweeteners, for example (Naveena et al., 2004; Ogino et al., 2008; Haddar et al., 2009; Merheb-Dini et al., 2009).



**Figure 6.** Effect of temperature on trypsin-like (A and B) and kallikrein-like (C and D) activities from *N. corniger* worker (A and C) and soldier (B and D) gut extracts.

### 3.5. Effects of *M. urundeuva* lectins on enzyme activities from *N. corniger* gut

Plant lectins with insecticidal activity may interfere in the activity of digestive enzymes by binding to glycosylated moieties of enzyme molecule (Macedo et al., 2007; Paiva et al., 2012). Thus, the investigation of the effects of lectins on insect enzymes is an important

step to unravel the insecticidal mechanisms. We evaluated whether the enzyme activities detected here can be modulated by termiticidal lectins from *M. urundeuva*.

Endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase activities from workers were not significantly affected after incubation of gut extracts with *M. urundeuva* lectins. Exoglucanase activity from worker gut extract was inhibited (51%) by MuHL and neutralized by MuBL. On the other hand, MuLL promoted an increase in about two times in this activity. MuBL, MuHL and MuLL had no effect on the activities of endoglucanase and exoglucanase from soldier gut extract, while the  $\beta$ -glucosidase activity from soldiers was slightly inhibited (28–34%) by the three lectins. These results indicate that *M. urundeuva* lectins did not affect the activity of the major cellulase (endoglucanase) found at *N. corniger* gut while the other cellulase activities were susceptible to modulation by lectin; however, the response was different between workers and soldiers. The type of activity modulation by the lectins differed only in regard to the effect on worker exoglucanase.

The three hemicellulase activities were also distinctly affected by lectins and the effects of MuBL, MuHL and MuLL on a same activity were more variable. The  $\beta$ -xylosidase activities from workers and soldiers were not affected by lectins while the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity from workers was inhibited by MuHL (100%) and MuLL (66%) and not affected by MuBL. From soldiers,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases were neutralized by MuBL and MuLL but were not affected by MuHL. The main hemicellulase ( $\beta$ -D-xylanase) activity was not affected by lectins in the case of workers but this activity from soldier gut extract was stimulated in 31% by MuBL and in 137% by MuHL, and not affected by MuLL. Both inhibition and stimulation of enzyme activities can lead to damage on digestion since enzymes like cellulases and hemicellulases usually act together in a balanced manner and deregulation of one activity results in impairment of the whole process.



MuBL, MuHL and MuLL stimulated (28%, 56% and 48%, respectively)  $\alpha$ -amylase activity from worker gut extract. MuHL and MuLL also promoted increase in activity from soldier gut extract (84% and 152%, respectively), while MuBL have no effect. Similarly, MuLL stimulated the  $\alpha$ -amylase activity from *A. aegypti* larvae and the lectin from *Bauhinia monandra* seeds stimulated  $\alpha$ -amylase from *Callosobruchus maculatus* (Macedo et al., 2007; Napoleão et al., 2012).

The protease activity from worker gut extract was inhibited by MuBL, MuHL and MuLL in 40.4, 53.7 and 27.0%. The activity of trypsin-like enzymes from workers was inhibited by MuBL (43%) and MuHL (37%) and was neutralized by MuLL, while the kallikrein-like activity from workers was not affected by lectins. The lectins also reduced the protease activity from soldiers in 30% (MuBL), 24% (MuHL) and 26% (MuLL) as well as neutralized the trypsin-like and kallikrein-like activities. The ingestion of proteins that inhibit proteolytic enzymes can interfere in the bioavailability of amino acids for biosynthesis of proteins required to growth and development of insect (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). MuLL also inhibited the trypsin-like activity from *A. aegypti* larvae (Napoleão et al., 2012).

In summary, MuBL, MuHL and MuLL were able to promote changes in activity of digestive enzymes from gut of *N. corniger* workers and soldiers. The *M. urundeuva* lectins affected distinctly the enzyme activities which may be a factor responsible for the different  $LC_{50}$  values determined for these lectins by Napoleão et al. (2011). Further studies aiming at to isolate and characterize the enzymes that are recognized by these lectins are in progress.

#### 4. Conclusion

In conclusion, the guts of *N. corniger* workers and soldiers contain cellulase (endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase), hemicellulase ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylanase),  $\alpha$ -amylase, and protease (trypsin-like, chymotrypsin-

like, and kallikrein-like) activities. Endoglucanase and  $\beta$ -xylanase were, respectively, the main cellulase and hemicellulase detected, indicating the high adaptability of these termites to digest the main components of lignocellulosic materials. Serine proteases were the main proteolytic enzymes detected and trypsin-like and kallikrein-like activities were found in highest levels. The patterns of the enzyme activities were different in workers and soldiers, revealing the presence of distinct digestive apparatus in these castes, which may be linked to their differential feeding behaviors. Termiticidal lectins from *M. urundeuva* affected the enzyme activities detected here and thus the mechanism of termiticidal activity may involve modulation of digestive enzyme activities by lectins. This study was a first step of detection and characterization of digestive enzymes from *N. corniger* and stimulates the purification and evaluation of the biotechnological potential of these proteins.

### Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowship (MLVO, LCBBC and PMGP). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support. L.C.B.B. Coelho and P.M.G. Paiva would like to the *Programa de Apoio a Núcleos de Excelência* (PRONEX) of the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE). T.A. Lima, T.H. Napoleão and E.V. Pontual would like to thank CNPq, CAPES and FACEPE for graduate scholarship, respectively. L.P. Dornelles would like to thank CNPq and *Universidade Federal de Pernambuco* for Scientific Initiation scholarship. The authors are also deeply grateful to Maria Barbosa Reis da Silva for the technical assistance.

## References

- Araújo, R.M.S., Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Carneiro-da-Cunha, M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Oliva, M.L.V., Paiva, P.M.G., 2012. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant Science* 183, 20-26.
- Azeez, A., Sane, A.P., Bhatnagar, D., Nath, P., 2007. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry* 68, 1352-1357.
- Bernardi, R., Tedeschi, G., Ronchi, S., Palmieri, S., 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* Hübner. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 883-889.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology* 1, 149-158.
- Bing, D.H., Weyand, J.G.M., Stavitsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124, 1166-1170.
- Carlini C. R., Grossi-de-Sá M. F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.
- Clark, A.G., Eisen, M.B., Smith, D.R., Bergman, C.M., Oliver, B., Markow, T.A., Kaufman, T.C., Kellis, M., Gelbart, W., Iyer, V.N., Pollard, D.A., Sackton, T.B., Larracuenta, A.M., Singh, N.D., Abad, J.P., Abt, D.N., Adryan, B., Aguade, M., Akashi, H., Anderson, W.W., Aquadro, C.F., Ardell, D.H., Arguello, R., Artieri, C.G., Barbash, D.A., Barker, D., Barsanti, P., Batterham, P., Batzoglou, S., Begun, D., Bhutkar, A., Blanco, E., Bosak, S.A., Bradley, R.K., Brand, A.D., Brent, M.R., Brooks, A.N., Brown, R.H., Butlin, R.K., Caggese, C., Calvi, B.R., Bernardo de Carvalho, A., Caspi, A., Castrezana, S., Celniker, S.E., Chang, J.L., Chapple, C., Chatterji, S., Chinwalla, A., Civetta, A., Clifton, S.W., Comeron, J.M., Costello, J.C., Coyne, J.A., Daub, J., David, R.G., Delcher, A.L., Delehaunty, K., Do, C.B., Ebling, H., Edwards, K., Eickbush, T.,

- Evans, J.D., Filipski, A., Findeiss, S., Freyhult, E., Fulton, L., Fulton, R., Garcia, A.C., Gardiner, A., Garfield, D.A., Garvin, B.E., Gibson, G., Gilbert, D., Gnerre, S., Godfrey, J., Good, R., Gotea, V., Gravely, B., Greenberg, A.J., Griffiths-Jones, S., Gross, S., Guigo, R., Gustafson, E.A., Haerty, W., Hahn, M.W., Halligan, D.L., Halpern, A.L. et al., 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450, 203-218.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Siddique, Y.H. (Ed.), *Recent Trends in Toxicology*, Vol. 37, Transworld Research Network, Kerala, pp. 47–59.
- Costa-Leonardo, A. M., 2002. *Cupins-praga: morfologia, biologia e controle*. Edifurb – Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
- Dojnov, B., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., Vujčić, Z. 2008. Purification and properties of midgut  $\alpha$ -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 153-160.
- Dreher-Lesnick, S.M., Ceraul, S.M., Lesnick, S.C., Gillespie, J.J., Anderson, J.M., Jochim, R.C., Valenzuela, J.G., Azad, A.F., 2010. Analysis of *Rickettsia typhi*-infected and uninfected cat flea (*Ctenocephalides felis*) midgut cDNA libraries: deciphering molecular pathways involved in host response to *R. typhi* infection. *Insect Mol. Biol.* 19, 229-241.
- Figueiredo, L. R., 2004. *Nasutitermes*: uma nova ameaça para os grandes centros urbanos. *Boletim Bay Pro Profissional* 3, 1.
- Fitches, E., Philip, J., Hinchliffe, G., Vercruysse, L., Chougule, N., Gatehouse, J.A., 2008. An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins. *Insect Sci.* 15, 483-495.

- Franco, O. L., Ridgen, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269, 397-412.
- Fujita, A., Abe, T., 2002. Amino acid concentration and distribution of lysozyme and protease activities in the guts of higher termites. *Physiol. Entomol.* 27, 76-78.
- Fujita, A., Miura, T., Matsumoto, T., 2008. Differences in cellulose digestive systems among castes in two termites lineages. *Physiol. Entomol.* 33, 73-82.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases and proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69.
- Graf, R., Briegel, H. Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L.). *Insect Biochem.* 15, 611-618.
- Grassé, P.P. 1949. Ordre des Isoptères ou termites, in: Grassé, P.P. (Ed.), *Traité de zoologie*, v.9, Masson, Paris, pp. 408-544.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavenis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour. Technol.* 100, 3366–3373.
- Hogan, M., Veivers, P.C., Slaytor, M., Czolij, R.T., 1988. The site of cellulose breakdown in higher termites (*Nasutitermes walkeri* and *Nasutitermes exitiosus*). *J. Insect Physiol.* 34, 891-899.
- Inoue, T., Moriya, S., Ohkuma, M., Kudo, T., 2005. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene* 349, 67-75.

- Jany, K. D., Haug, H., Ishay, J., 1978. Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. Insect Biochem. 8, 221–230.
- Ji, R., Brune, A., 2005. Digestion of peptidic residues in humic substances by an alkali-stable and humic-acid-tolerant proteolytic activity in the gut of soil-feeding termites. Soil Biol. Biochem. 37, 1648-1655.
- Kelley, K.R., Stevenson, F.J., 1996. Organic forms of N in soil, in: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier, Amsterdam, pp. 407-427.
- Khademi, S., Guarino, L. A., Watanabe, H., Tokuda, G., Meyer, E. F., 2002. Structure of an endoglucanase from termite, *Nasutitermes takasagoensis*. Acta Cryst. D 58, 653-659.
- Knicker, H., Schmidt, M.W.I., Kögel-Knabner, I., 2000. Nature of organic nitrogen in fine particle size separates of sandy soils of highly industrialized areas as revealed by NMR spectroscopy. Soil Biol. Biochem. 32, 241-252.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lam, W., Coast, G.M., Rayne, R.C., 2000. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 85-94.
- Li, Y., Yin, Q., Ding, M., Zhao, F., 2009. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- $\beta$ -1,4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullaria crosseana*. Comp. Biochem. Physiol. B 153, 149-156.
- Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S., Shih, J.C.H., 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3271–3275.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol. A 146, 486-498.
- Mamma, D., Hatzinikolaou, D., Kekos, D., Stamatis, H., Kalogeris, E., 2009. Adsorption of major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* on cellulosic substrates. World J. Microbiol. Biotechnol. 25, 781–788.
- Marchetti, S., Chiabà, C., Chiesa, F., Bandiera, A., Pitotti, A., 1998. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 449-458.
- Mares-Guia, M.; Diniz, C.R. Studies on the mechanism of rat urinary kallikrein catalysis, and its relation to catalysis by trypsin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 121, 750-756, 1967.
- McEwen, S.E., Slaytor, M., O'Brien, R.W., 1980. Cellobiase activity in three species of Australian termites. Insect Biochem. 10, 263-567.
- Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdes-Rodriguez, S., Delano-Frier, J., Blanco-Labra, A., 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comp. Biochem. Physiol. B 126, 425-433.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., Silva, R., 2009 Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae N31). Food Chemistry, 120, 87-93.
- Miller, J. W., Kramer, K. J., Law, J. H., 1974. Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). Comp. Biochem. Physiol. B, 48, 117–129.

- Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Albuquerque, A.C., Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G., 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. Int. Biodeterior. Biodegrad. 65, 52-59.
- Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. Parasitology Research 110, 609-616.
- Naveena, B. M., Mendiratta, S. K., Anjaneyulu, A. S. R., 2004. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* Roxb (Kachri) and *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger rhizome). Meat Science 68, 363-369.
- Ogino, H., Otsubo, T., Ishikawa, H., 2008. Screening, purification, and characterization of a leather-degrading protease. Biochem. Eng. J. 38, 234-240.
- Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. Regul. Toxicol. Pharmacol. 45, 144-158.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 113-118.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2012. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. In: Pourali, K.; Raad, V.N. (Eds.), Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle. New York: Nova Science Publishers, Inc.



- Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., 2011a. Insecticidal activity of lectins and secondary metabolites. In: Perveen, F. (Ed.), *Insecticides – Advances in integrated pest management*, InTech, Rijeka, pp. 579-598.
- Paiva, P.M.G., Santana, G.M.S., Souza, I.F.A.C., Albuquerque, L.P., Agra-Neto, A.C., Albuquerque, A.C., Luz, L.A., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2011b. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 982-989.
- Pasti, M.B., Belli, M.L., 1985. Cellulolytic activity of Actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. *FEMS Microb. Lett.* 26, 107-112.
- Prins, R.A., Kreulen, D.A., 1991. Comparative aspects of plant cell wall digestion in insects. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32, 101-118.
- Priya, S., Kaur, N., Gupta, A.K., 2010. Purification, characterization and inhibition studies of  $\alpha$ -amylase of *Rhyzopertha dominica*. *Pest. Biochem. Physiol.* 98, 231-237.
- Purich, D. L., 2010. Factors influencing enzyme activity, in: Purich, D. L. (Ed.) *Enzyme kinetics: catalysis & control – A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Elsevier.
- Rehman, F.U., Aslam, M., Tariq, M.I., Shaheen, A., Sami, A.J., Naveed, N.H., Batool, A.I., 2009. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). *Afr. J. Biotechnol.* 8, 6710-6715.
- Rouland, C., Renoux, J., Petek, F., 1988. Purification and properties of two xylanases from *Macrotermes mülleri* (Termitidae, Macrotermitinae) and its simbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Insect Biochem.* 18, 709-715.
- Rouland, C., Lenoir-Rousseaux, J. J., Mora, P., Renoux, J., 1989. Origin of the exo-cellulase and the  $\beta$ -glucosidase purified from the digestive tract of the fungus-growing termite *Macrotermes muelleri*. *Sociobiology* 15, 237-246.

- Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 460-464.
- Sá, R.A., Santos, N.D.L., Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 300-306.
- Silva, M.D.C., Sá, R.A., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 334-340.
- Souza, J.D., Silva, M.B.R., Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Sá, R.A., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Silva, M.D.C., Coelho, L.C.B.B., 2011. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 696-702.
- Sun, J-Z.; Scharf, M.E., 2010. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Sci.* 17, 163–165.
- Tan, L.U.L., Mayers, P., Saddler, J.N., 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiol.*, 33, 689–694.
- Tayasu, I., Abe, T., Eggleton, P., Bignell, D.E., 1997. Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. *Ecol. Entomol.* 22, 343-351.

- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109, 1-62.
- Tokuda, G.; Saito, H.; Watanabe, H., 2002. A digestive  $\beta$ -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1681-1689.
- Veivers, P.C., Musca, A.M., O'Brien, R.W., Slaytor, M., 1982. Digestive enzymes of the salivary glands and gut of *Mastotermes darwiniensis*. *Insect Biochem.* 12, 35-40.
- Waller, D.A., La Fage, J.P., 1986. Nutritional ecology of termites, in: Slansky Jr. F., Rodriguez, J.G. (Eds.), *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates* John Wiley & Sons, New York, pp. 487-532.
- Wang, J., Ding, M., Li, Y.H., Chen, Q.X., Xu, G.J., Zhao, F.K., 2003. Isolation of a multifunctional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crosseana*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35, 941-946.
- Warnecke F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, G.H., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernández, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P., Leadbetter, J.R., 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature.* 450, 560-565.
- Yezdani, E., Sendi, J.J., Zibae, A., Ghadamyari, M., 2010. Enzymatic properties of  $\alpha$ -amylase in the midgut and the salivary glands of mulberry moth, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *C. R. Biol.* 333, 17-22.

- Zeng, F., Zhu, Y., Cohen, A., 2002. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. Comp. Biochem. Physiol. B 131, 453-463.
- Zhu, Y-C., Baker, J.E., 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 1053-1063.
- Zibae , A., Bandani, A.R., Kafil, M., Ramzi, S., 2008. Characterization of  $\alpha$ -amylase in the midgut and the salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). J. Asia Pacific Entomol. 11, 201-205.

## 6. CONCLUSÕES

- Extratos de intestino de operários e soldados de *N. corniger* apresentaram atividades de enzimas celulolíticas (endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases), hemicelulolíticas ( $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e  $\beta$ -xilanases), amilolítica ( $\alpha$ -amilase) e proteolíticas (tripsina-símile, quimotripsina-símile e calicreína-símile).
- Endoglucanases e  $\beta$ -xilanases foram, respectivamente, as principais celulase e hemicelulase detectadas, indicando a adaptabilidade de *N. corniger* para digerir os componentes majoritários de materiais lignocelulósicos.
- As principais enzimas proteolíticas presentes nos extratos foram serino proteases. As atividade tripsina-símile e calicreína-símile foram detectadas em maior nível.
- Os padrões detectados e os efeitos de temperatura e pH para as atividades enzimáticas em operários e soldados revelam a presença de aparatos digestivos distintos entre as casta, o que pode estar relacionado a seus diferentes comportamentos alimentares.
- Lectinas termiticidas de *M. urundeuva* afetaram de formas diferentes as atividades enzimáticas detectadas e, portanto, o mecanismo da atividade termiticida pode envolver a modulação das atividades de enzimas digestivas pelas lectinas.